

BAND 26, HEFT 3

MAI 1956

PHYTOPATHOLOGISCHE ZEITSCHRIFT

Begründet von Prof. Dr. E. Schaffnit

Unter Mitwirkung von

Prof. Dr. E. Baldacci, Mailand / Prof. Dr. H. Braun, Bonn / Prof. Dr. W. B. Brierley,
Keswick-Cumberland / Prof. Dr. T. Hemmi, Kyoto / Oberreg.-Rat i. R. Dr. E. Köhler,
Braunschweig / Prof. Dr. K. O. Müller, Canberra / Prof. Dr. H. M. Quanjer, Wageningen
Prof. Dr. Tr. Savulescu, Bukarest / Prof. Dr. E. C. Stakman, St. Paul

herausgegeben von den Professoren

E. Gäumann
Zürich

M. Klinkowski
Aschersleben

H. Richter
Berlin-Dahlem

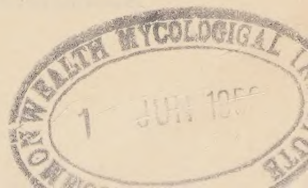


Mit 36 Abbildungen und 4 Farbtafeln

1956

PAUL PAREY IN BERLIN UND HAMBURG

Phytopath. Z. Bd. 26, Heft 3, S. 225—332, Berlin 1956



INHALT

Abhandlungen

WOESTE, U., Anatomische Untersuchungen über die Infektionswege einiger Wurzelpilze. Mit 21 Abbildungen im Text und 4 Farbtafeln	225
REUSSER, P. und NAEF-ROTH, St., Über den Einfluß der Fusarinsäure auf den Gaswechsel von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Hans. Mit 5 Abbildungen	273
WAITZ, L. und SCHWARTZ, W., Untersuchungen über die von <i>Pseudomonas phaseolicola</i> (Burkh.) hervorgerufene Fettfleckenkrankheit der Bohne. II. Untersuchungen zur Pathogenese. Mit 6 Abbildungen	297
KUHFUSS, K.-H., Über die Bedeutung der Sporendichte bei der künstlichen Infektion von <i>Linum usitatissimum</i> L. mit <i>Colletotrichum lini</i> Manns et Bolley. Mit 3 Abbildungen	313
BERCKS, R. und ZIMMER, K., Über den serologischen Nachweis der virösen Rübenvergilbung und den Virusgehalt kranker Rüben. Mit einer Abbildung	323
Besprechungen	331

Manuskripte: In deutscher, englischer, französischer oder italienischer Sprache abgefaßte Originalarbeiten werden druckfertig und möglichst in Schreibmaschinenschrift erbeten. Aufnahme von Tabellen und Abbildungen unterliegt jeweils vorheriger Vereinbarung.

„Kurze Mitteilungen“ sind solche Veröffentlichungen in den vorerwähnten Sprachen, die im allgemeinen einen Umfang von vier Druckseiten nicht übersteigen. Sie erscheinen möglichst schon im nächsten Heft.

Die „Besprechungen“ erscheinen nur in deutscher Sprache.

Herausgeber: Prof. Dr. E. Gäumann, Zürich 6, Universitätsstraße 2, Prof. Dr. M. Klinkowski, Aschersleben, Ermslebener Str. 52, und Prof. Dr. H. Richter, Berlin-Dahlem, Königin-Luise-Str. 19.

Zusendung der Manuskripte von Originalarbeiten und „Kurzen Mitteilungen“ entweder an den Verlag Paul Parey, Berlin SW 68, Lindenstraße 44/47, oder an einen der drei Herausgeber.

Zusendung der „Besprechungen“ unmittelbar an Prof. Richter, Berlin-Dahlem. Soweit nicht eine Aufforderung der Herausgeber zur Besprechung bestimmter Arbeiten ergangen ist, empfiehlt es sich, Prof. Richter vorher von der Absicht der Besprechung zu verständigen.

Honorierung: Das Mitarbeiterhonorar für Originalarbeiten und „Kurze Mitteilungen“ beträgt 32,— DM je Druckbogen von 16 Seiten. Bei Beiträgen von mehr als drei Bogen werden nur die ersten drei Bogen honoriert; Dissertationen und Buchbesprechungen sind honorarfrei.

Sonderdrucke: Jeder Mitarbeiter erhält unberechnet 20 Sonderdrucke seines Beitrages (Originalarbeiten und Kurze Mitteilungen). Mehrbedarf gegen Berechnung.

Erscheinungsweise: Die Zeitschrift erscheint in zwangloser Folge. Jährlich erscheinen etwa 10—12 Hefte, von denen 4 einen Band bilden. Jeder Band enthält etwa 30 Druckbogen.

Bezugsbedingungen: Der Preis des Bandes richtet sich nach dem Umfang. Er beträgt je Druckbogen von 16 Seiten etwa 3,— DM. Die Hefte sind auch einzeln käuflich. Das Abonnement verpflichtet zum Bezug eines ganzen Bandes. Es verlängert sich jeweils, falls nicht spätestens unverzüglich nach Eingang der letzten Lieferung des berechneten Bandes Abbestellung erfolgt.

Anatomische Untersuchungen über die Infektionswege einiger Wurzelpilze

Von

ULRIKE WOESTE

Mit 21 Abbildungen im Text und 4 Farbtafeln

Inhalt: Einleitung. — Material und Technik. 1. Material; 2. Fixieren, Einbetten, Schneiden; 3. Färben. — Untersuchungen. A. Zur Einführung: Die Wurzelpilze der Orchideen. B. *Rosellinia quercina* an Eiche. 1. Spezielle Methodik; 2. Makroskopische Untersuchungen; 3. Mikroskopische Untersuchungen; a) Infektion von Wurzelspitzen, b) Infektion durch die Basis von Seitenwurzeln, c) Infektion durch Lenticellen, d) Andere Infektionsweisen; 4. Zusammenfassung. C. *Trametes radiciperda* an Fichte. 1. Spezielle Methodik; 2. Bisherige Literatur; 3. Makroskopische Untersuchungen; 4. Mikroskopische Untersuchungen; a) Wund- und Lenticelleninfektion, b) Infektion unmittelbar durchs Periderm; 5. Zusammenfassung. D. *Armillaria mellea* an Fichte. 1. Bisherige Literatur; 2. Spezielle Methodik; 3. Makroskopische Untersuchungen; 4. Mikroskopische Untersuchungen; a) Festheften der *Rhizomorpha subterranea*, b) Entwicklung und Vorstoß der *Rhizomorpha fragilis*, c) Destruktion und Durchdringung des Bastes, d) *Rhizomorpha subcorticalis* und Infektion des Holzkörpers, e) Abwehrreaktionen; 5. Zusammenfassung. — Diskussion. — Zusammenfassung. — Literaturverzeichnis.

Einleitung

„Was in der Erde steckt, ist des Teufels“, so heißt es in der Überlieferung alter Volksmärchen. Wenn auch dieser Aberglaube nicht für die Vernachlässigung der Untersuchungen über Baumwurzeln verantwortlich gemacht werden kann, so ist es doch eine Tatsache, daß unter der großen Zahl von Forschungsberichten der Botanik der Prozentsatz derer, die sich mit speziellen Fragen der Gehölzwurzel, vor allem aber mit ihrer pathologischen Anatomie beschäftigen, äußerst gering ist. Wer jemals das Wurzelwerk eines Baumes auszugraben versucht hat, wird wissen, warum gerade diese unterirdischen Pflanzenteile dem Lichte der Wissenschaft bisher so relativ verborgen geblieben sind.

Der große Anatom und Pathologe ROBERT HARTIG steht mit seinen Untersuchungen über die pathologische Wurzelanatomie fast einzig da. Als überaus sorgfältiger Beobachter war er bahnbrechend auf dem Gebiete der

Baumkrankheiten, und so verdanken wir ihm vor allem die Kenntnis über die genaue Lokalisierung der holzzerstörenden Pilze. Nach dem Tode HARTIGS schloßen die Untersuchungen in diesem Arbeitsbereich fast völlig ein. Als rühmliche Ausnahme erwähnt zu werden verdienen KÜSTER (Pathologische Pflanzenanatomie 1925) und THOMAS (Untersuchungen über *Armillaria mellea* 1934). Durch das Erscheinen des Lehrbuches von GÄUMANN über die „Pflanzliche Infektionslehre“ (1946) erhielten die Probleme einen neuen Impuls. So war es GÄUMANN, der zum ersten Mal in der Literatur einem Kapitel die Überschrift „Infektionswege“ gab, und mich zu meinen Untersuchungen über das Eindringen der Wurzelpilze anregte. Wenn auch, wie schon erwähnt, einzelne Beobachtungen auf diesem Gebiet vorliegen, so konnte doch bisher die Frage, ob die Wurzelpilze stets einen bestimmten anatomisch vorgebildeten Weg in das Innere der Wurzel benützen, wie es z. B. bei den Mykorrhizapilzen der Orchideen zutrifft, oder ob erst Wundstellen eine Infektion ermöglichen, von keiner Seite mit Sicherheit beantwortet werden. Herr Professor HUBER ermunterte mich daher, einmal dieser Frage nachzugehen, vor allem bei den Wurzelpilzen, die ältere Baumbestände befallen und somit die Fähigkeit besitzen, auf bisher ungeklärte Weise dicke Peridermschichten zu durchdringen.

Es wird die Aufgabe der vorliegenden Arbeit sein, das schon vorhandene Wissen durch genaue Beobachtungen zu ergänzen und eine Vorstellung vom Vordringen einiger Wurzelpilze an Hand guter Abbildungen zu vermitteln. Denn gleichzeitig mit der Erforschung des Infektionsweges soll dem offensichtlichen Mangel an wirklich naturgetreuen Bildern abgeholfen werden. Die Mikrophotographie hat dabei den Vorzug der Objektivität, da aus idealisierten Zeichnungen leicht eine völlig falsche Vorstellung resultiert. Die Anschaulichkeit der Abbildungen soll vor allem auch durch die Bunt aufnahmen verstärkt werden, da der Farbkontrast das Pilzmyzel weit deutlicher in Erscheinung treten läßt, als dies bei Schwarzweiß-Photographien möglich ist.

An Hand dieser Erhebungen, welche den Hauptteil meiner Arbeit ausmachen, soll abschließend die Frage nach den Vorbedingungen für die verschiedenen Arten der Wurzelinfektion diskutiert werden.

Die nachstehenden Untersuchungen wurden am Forstbotanischen Institut der Universität München unter der Leitung von Herrn Professor Dr. B. HUBER ausgeführt. Es ist mein aufrichtiger Wunsch, an dieser Stelle meinem hochverehrten Lehrer für die Anregung zu dieser interessanten Aufgabe und die unermüdliche Förderung und Unterstützung meiner Arbeit herzlich zu danken. Ferner möchte ich Herrn Oberforstmeister Professor Dr. F. ERNST, Anzing, der mich bei der oft schwierigen Materialbeschaffung stets freundlich unterstützte, sowie allen denen, die den Fortgang der Arbeit gefördert haben, meinen Dank aussprechen.

Die mikrophotographischen Aufnahmen wurden teils mit dem Mikrophotoapparat der Firma Leitz, teils mit einem Zeiß-Mikroskop mit aufgesetztem Kamerabalg ausgeführt. Der technischen Assistentin des Instituts, Fräulein A. JOHN, und dem Leiter der mikrophotographischen Abteilung der Firma Henkel & Co, Düsseldorf, Herrn W. HEUMANN, gebührt für die Photoarbeiten besonderer Dank.

Material und Technik

1. Material

Zu meinen Untersuchungen wählte ich die Wurzelrinden infizierter und als Vergleichsmaterial auch die gesunder Bäume. Bei der oft schwierigen Materialbeschaffung mußte besonders darauf geachtet werden, Wurzeln in jedem Infektionsstadium aufzufinden. Zur Verwendung kamen dann vor allem Proben, denen man die Infektion äußerlich erst wenig ansah. Stark befallene Wurzeln erwiesen sich bei mikroskopischer Untersuchung meist schon als so weitgehend zersetzt, daß die Anatomie der Infektionswege nicht mehr zu erkennen war. Die Untersuchungen von *Rosellinia quercina* wurden entsprechend dem normalen Befallsalter an zwei- bis dreijährigen Eichenpflanzen ausgeführt; bei den anderen Wurzelpilzen kamen nur ältere Wurzeln zur Betrachtung, da mein Interesse vor allem den Pilzen galt, die die Fähigkeit besitzen, in stark verkorkte Wurzeln einzudringen.

2. Fixieren, Einbetten, Schneiden

Alle Pilzkrankheiten wurden nach zwei Richtungen hin untersucht: 1. Untersuchungen der äußeren Krankheitssymptome mittels Lupe und Auflichtmikroskop. 2. Herstellung von Schnittpräparaten zur mikroskopischen Untersuchung mittels Durchlicht.

Zu 2: Zur Fixierung des Materials erwies sich Alkohol in den meisten Fällen als nicht besonders günstig für eine erfolgreiche Färbung der Präparate. Es mußten daher feinere Fixierungsmethoden angewendet werden. Als gut geeignet erwies sich Formol, besser noch BOUINS Fixierungsgemisch (Pikrinsäure-Formol-Eisessig: Näheres siehe ROMETS Seite 69). Die Materialstückchen blieben zwei oder auch mehr Tage in dem Fixiergemisch. Eine Hitze-fixierung, wie SCHMID sie angibt, zeigte sich als unbrauchbar, da die durch den Pilzbefall meist stark verharzte Rinde dabei vollständig verklebt. Eine Einbettung in Zelloidin eignete sich in allen Fällen sehr gut (siehe KISSER 1939, S. 643). Das Schneiden saftfrischer Rinden, wie es HOLDHEIDE (1951) für gesundes Material angibt, stößt bei pilzbefallenen Rinden fast immer auf außerordentliche Schwierigkeiten. Unter dem Einfluß der Hyphen sind die Zellen oft auseinandergedrängt oder auf irgendeine Weise geschädigt, so daß nur mit Hilfe der Zelloidineinbettung das Material in seiner ursprünglichen Form erhalten und eine eventuelle Desorganisation durch den Pilz genau beobachtet werden kann. Bei saftfrischem Schneiden besteht außerdem die Gefahr, daß sich die feinen Pilzfäden aus dem Gewebe herauslösen und somit ein falsches Bild entsteht. Die Schnitte wurden mit dem Holzmikrotom in einer Dicke von etwa 10 bis 20 μ hergestellt.

3. Färben

Das Färben der Schnitte ist in fast allen Fällen unerlässlich, da sich die Pilzhypen erst bei einer geeigneten Färbung in den Geweben auffinden lassen. Hierbei stößt man auf große Schwierigkeiten, da die Rinde aus außerordentlich vielen verschiedenen Gewebarten aufgebaut ist, so daß sich bei keiner mir bekannten Färbemethode die Hypen allein durch ihre Färbbarkeit von ihrer Umgebung kontrastreich abheben würden. Dazu reagiert fast jeder Pilz etwas anders auf die Färbemittel, ebenso die meist leicht färbbaren Substanzen, die in den pathologisch veränderten Wirtsgeweben entstehen, wie zum Beispiel Harzabscheidungen.

Eine große Hilfe beim Auffinden der geeigneten Färbemethode war mir die Arbeit von SCHMID (1954), die im Zuge einer Untersuchung über die histologische Spezialisierung von Rindenpilzen alle zur Verfügung stehenden Färbemittel sorgfältig geprüft hatte. Ich möchte daher die verschiedenen Möglichkeiten nicht diskutieren, sondern verweise auf diese Arbeit. Kurz erwähnt sei hier nur die von mir schließlich bevorzugte Färbemethode und die durch sie hervorgerufene Gewebedifferenzierung: Die besten Erfolge konnte ich mit der Färbung nach CARTWRIGHT (1929) erzielen, die dort zum Nachweis von Pilzhypen im Holz angewendet wurde. Sie eignet sich für frische und fixierte Schnitte: Nach der Färbung in wäßriger Safraninlösung werden die Schnitte in einem Pikrinsäure-Anilinblau-Gemisch bis kurz vor dem Siedepunkt erhitzt. Dann wird mit

Alkohol möglichst lange ausgewaschen. Bei den meisten Objekten können die Schnitte nach Fixierung und Färbung tagelang im Alkohol bleiben, da vor allem der blaue Farbstoff sehr stark haftet. Der plasmatische Inhalt der Hyphen ist nun blau gefärbt und tritt in der Peridermschicht neben den stark rot gefärbten Korkzellen und im Holz neben den mattroten Tracheidenwänden kontrastreich hervor. Auch an den Stellen, an denen der Pilz ganze Hyphenstränge bildet, ist das Myzel durch seine Färbung leicht zu erkennen. Allerdings färbt sich auch der plasmatische Inhalt der Markstrahlen, der Parenchym- und Siebzellen und das Kambium blau an. Dadurch wird die Identifizierung des Pilzes in der Rinde erschwert. Nach einiger Übung konnten in vielen Fällen feine Farbunterschiede zwischen dem Hyphenplasma und dem Wirtszellplasma festgestellt werden. Soweit die nicht gefärbte Hyphenwand sichtbar war, bot diese natürlich den wichtigsten Anhaltspunkt. Stark geschädigte Gewebeteile wurden nach der CARTWRIGHTSchen Methode meist bräunlichrot gefärbt; violette Farben zeigten die oft verharzten Parenchymzellen durch die Überlagerung von Blau (Plasma) und Rot (Harz). Auffallend ist, daß die stark zersetzte Rinde, selbst bei sorgfältigster Untersuchung, oft keine blau gefärbten Hyphen zeigt. Ältere Hyphen färben sich im Kork und in den bräunlichrot erscheinenden, geschädigten Parenchymzellen der verharzten Rinde anscheinend nur schwer an. Dagegen kann man ihre Konturen in diesen Zellen bei stärkster Vergrößerung oft recht gut beobachten.

Die Verwendung des Phasenkontrastmikroskopes zur Aufklärung besonderer anatomischer Verhältnisse sowie spezielle Färbungsmethoden für den Nachweis bestimmter Elemente möchte ich nicht hier, sondern der Anschaulichkeit halber erst jeweils bei dem zugehörigen Objekt besprechen. Erwähnt sei nur noch, daß die Mykorrhizapilze nach den Angaben von BURGEFF mit Eosin und Hämatoxylin (Näheres siehe ROMEIS Nr. 660 und Nr. 158: Färbung nach DELAFIELD) angefärbt wurden, wodurch den verschiedenen Hyphenarten ein nuancenreiches Aussehen verliehen wird.

Als Einschlusmittel eignete sich für alle Präparate Euparal vorzüglich (siehe ROMEIS Nr. 850). Es lieferte außerordentlich klare Bilder und hat in der Anwendung gegenüber Kanadabalsam und Glycerin große Vorzüge, da durch die Vermeidung von Xylol und hochkonzentriertem Alkohol die Schnitte weniger stark gehärtet und dadurch schonender behandelt werden können.

Die Zeichnungen wurden, wenn nicht anders angegeben, mit dem Zeichenapparat in der Höhe des Objekttisches entworfen. Die Aufnahmen wurden teils mit dem Panphot der Firma Leitz, teils mit einem Zeiß-Mikroskop mit aufgesetztem Kamerabalg hergestellt. Sofern eine Retuschierung vorgenommen wurde, ist dies unter der entsprechenden Aufnahme vermerkt. Nähere Erklärungen der Abbildungen befinden sich im Text.

Untersuchungen

A. ZUR EINFÜHRUNG: DIE WURZELPILZE DER ORCHIDEEN

Zu den wenigen hochspezialisierten Wurzelpilzen, deren Weg in die Pflanze einwandfrei klargestellt wurde, gehören vor allem die Mykorrhizapilze der Orchideen (BURGEFF 1909). Ich möchte an Hand einiger Nachuntersuchungen an *Spiranthes spiralis* kurz Aufschluß über den Infektionsweg dieses Pilzes geben. Ich halte es für angebracht, diesen Vertreter zur Einführung näher zu betrachten, um eine anschauliche Hilfe zur Klärung der allgemeinen Problemstellung zu geben.

Die Wurzelhaare der Orchideen und die sie bildenden jüngsten Epidermiszellen sind nicht kutinisiert¹⁾ und deshalb auch Pilzen zugänglich,

¹⁾ Nähere Angaben bei GUTTENBERG 1940.

welche die Kutikula nicht zu perforieren vermögen. Für die Mykorrhizapilze der Orchideen stellen die Wurzelhaare auf diese Weise die einzig mögliche Eintrittspforte dar, und sie nützen diesen anatomisch vorgebildeten Infektionsweg in größtem Maße aus. Trifft eine Pilzhyphe, chemotropisch angelockt (BERNARD 1909), auf ein Wurzelhaar in der Nähe der Spitze, so schwillt die Hyphe an dieser Stelle

an und perforiert unter deutlicher Appression die Wand (Abb. 1). Sie dringt dann ins Innere des Wurzelhaares vor und wächst geradewegs auf die Wurzel zu. Hierbei kommt es häufig zu Verzweigungen, welche wiederum ausschließlich in Richtung auf die das Wurzelhaar bildende Epidermiszelle zustreben (Abb. 2). Sobald die Hyphen die Epidermiszelle erreicht haben, brechen sie unter deutlicher Einschnürung durch die Membran und passieren die subepidermale Zellschicht. Die Ausbreitung des aus etwa 4μ dicken Hyphen bestehenden Myzels findet nach dem Eindringen in die Wurzelzellen nicht nach allen Seiten hin gleichmäßig statt. Die äußerste unter der Epidermis gelegene Schicht bleibt stets pilzfrei wie diese selbst, erst die zweite und dritte füllt sich mit locker verschlungenen Hyphen an. Man bezeichnet diese Zellen, die

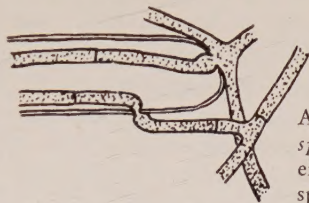


Abb. 1. *Spiranthes spiralis*. Infektion einer Wurzelhaar-spitze. (1 : 400)

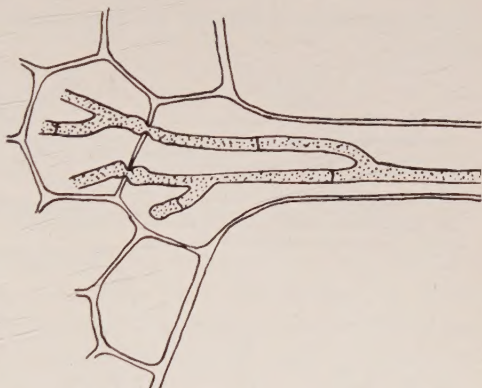


Abb. 2. *Spiranthes spiralis*. Infektionshyphen vom Wurzelhaar in das Rindengewebe der Wurzel unter mehrmaliger Verzweigung eindringend. (1 : 400)

dünnwandig und kleingetüpfelt sind und dadurch ein leichtes Ausbreiten des Pilzes ermöglichen, als Pilzwirtzellen. Von hier aus erfolgt die Invasion der inneren großzelligen Rindenschichten der Wurzel bis zur Endodermis hin, ohne diese jedoch zu berühren. Auf die Pilzverdauung des Pflanzenplasmas in diesen Zellen will ich hier nicht eingehen (BURGEFF 1909), weil damit der Rahmen dieser Arbeit überschritten würde. Während all dieser Vorgänge gedeihen die Hyphen der Pilzwirtzellen üppig und entsenden nach einiger Zeit eine Anzahl Hyphen zurück in den Boden. Der Weg, auf dem diese sogenannten Emissionshyphen die Wurzel wieder verlassen, entspricht genau dem der Infektionshyphen. Durch die subepidermale Schicht hindurch gelangen sie in die Epidermiszelle und von hier aus in die Wurzelhaare. Bei dieser Auswanderung verlaufen die Hyphen unter sehr häufiger Verzweigung und Anastomosenbildung bis in die Spitze, wo sie teils enden, teils durch Perforation der Wandung ins Freie gelangen

(Abb. 3). Die Emissionshyphen sind dickwandig und relativ plasmaarm und ihre Verzweigungen sind stets der Wurzelspitze zugewandt, so daß sie sich im allgemeinen leicht von den Infektionshyphen unterscheiden lassen. In einigen Wurzelhaaren dagegen kann man ein ganz anderes Bild beobachten. Hier sind die Emissionshyphen dünner und ihr Inhalt ist auffallend plasmareich. Diese Hyphen dienen der Fortpflanzung des Pilzes und werden daher auch **Reproduktionshyphen** genannt (Abb. 4). Sie gehen an ihrem Ende meist in Sporen über, die perlschnurartig aufgereiht und stark lichtbrechend sind und den Wurzelhaaren schon bei schwacher Vergrößerung ein auffallendes Gepräge geben (Abb. 5)¹⁾. Dieser Modus ist stets derselbe vom ersten Anfang der Infektion bis zum Austreten bzw. bis zur Sporenbildung der Emissionshyphen. Denn einmal infiziert, verliert das Wurzelhaar, dessen Inhaltsstoffe verschwinden, sobald es von einer Hyphe durchdrungen wird, seine anziehenden Eigenschaften auf den Wurzelpilz; nahrungsarme Zellen sucht der Pilz nicht auf (BERNARD 1909). Die Pflanze bleibt gegen eine neue Infektion so lange geschützt, bis andere Wurzelhaare gebildet werden.

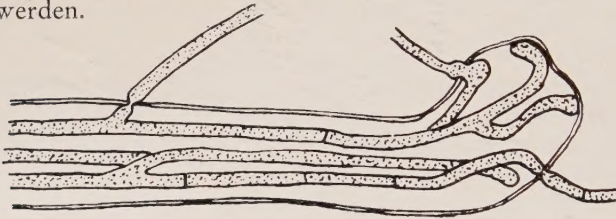


Abb. 3. *Spiranthes spiralis*.
Verlauf der Emissions-
hyphen in einem Wurzel-
haar. (1 : 400)

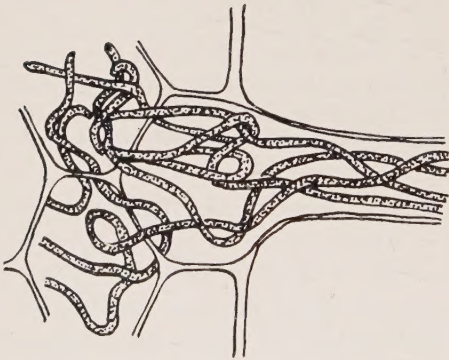


Abb. 4. *Spiranthes spiralis*. Auswan-
derung der reproduktiven Hyphen.
(1 : 400)



Abb. 5. *Platanthera chlorantha*.
Sporenbildung im Wurzelhaar an
plasmareichen Emissionshyphen.
(1 : 225) Nach BURGEFF

¹⁾ Da *Spiranthes spiralis* keine Sporenbildung zeigt (vgl. McDUGAL, 1899), wurde Abb. 5 BURGEFFS Arbeit über „die Wurzelpilze der Orchideen“ entnommen.

B. *ROSELLINIA QUERCINA* AN EICHE

An die Spitze meiner Untersuchungen stelle ich *Rosellinia quercina*, den Eichenwurzeltöter, weil dieser Pilz nächst den Mykorrhizapilzen der Orchideen am stärksten auf einen anatomisch vorgebildeten Infektionsweg spezialisiert ist.

1. Spezielle Methodik

Das untersuchte Material entstammt einem durch *Rosellinia* stark befallenen Pflanzgarten im Forstamt Anzing. Die Pflanzen wurden zu verschiedenen Jahreszeiten und in unterschiedlichen Befallsstadien dem Boden entnommen. Um eine eventuell unterschiedliche Anfälligkeit durch die Dicke der Peridermschicht zu ermitteln, wurden verschiedene Altersklassen (ein- bis dreijährige Pflanzen) untersucht. Da sich vor allem bei den im Spätsommer dem Boden entnommenen Pflanzen die Rinde sehr leicht ablöste, konnte auf eine Einbettung in Zelloidin vor dem Schneiden in keinem Fall verzichtet werden. Schnitte in allen drei Schnittrichtungen erwiesen sich für eine genaue Untersuchung notwendig. Die oben beschriebene Färbung nach CARTWRIGHT war besonders für die Übersichtsbilder sehr günstig, da sich das Myzel stark blau anfärbt, und sich von den intensiv rot gefärbten Korkzellen gut abhebt. Ungefärbte Präparate wurden stets zum Vergleich herangezogen. Zur makroskopischen Beobachtung der Infektionsvorgänge wurden einige Eichenpflanzen in verschiedenen Abständen in Wasser gestellt. Hierzu dienten Glasgefäße, die die Beobachtung erleichterten. Sie wurden, um eine Algenbildung zu verhindern und den Wurzeln natürliche Lichtverhältnisse zu gewährleisten, mit schwarzem Papier abgedunkelt.

2. Makroskopische Untersuchungen

Rosellinia quercina gehört zur Familie der *Sphaeriaceae* (*Sphaeriales*; Näheres siehe GÄUMANN 1926). Der Pilz weist eine außerordentlich große Mannigfaltigkeit der Erscheinungsformen auf; ein Studium derselben ist vor den speziellen Untersuchungen unerlässlich. Ich möchte hier nicht näher darauf eingehen, sondern verweise auf HARTIG (1880).

Die durch *Rosellinia quercina* hervorgerufene Krankheit befällt fast ausschließlich ein- bis dreijährige Eichenpflanzen; ganz selten, und daher auch ohne praktische Bedeutung, ist der Befall älterer Bäume, da sich Altbestände im allgemeinen für diese Krankheit unempfindlich zeigen. Sie ertragen in ihrem Wurzelwerk symptomlos das Myzel und infizieren in ihrer Umgebung angelegte Pflanzgärten und Schonungen. Der Pilz richtet dann in kürzester Zeit die Jungpflanzen zugrunde. Der Befall äußert sich in der Weise, daß sich die Blätter zuerst an der Spitze des Triebes verfärben und absterben, dann vertrocknet die ganze Pflanze innerhalb sehr kurzer Zeit, besonders bei feuchtwarmer Witterung im Juli und August. Die Erkrankung der jungen Eichenpflanzen äußert sich oberirdisch erst in einem sehr späten Entwicklungsstadium, d. h. in der Regel erst dann, wenn die Wurzeln größtenteils schon getötet sind.

Zieht man eine Pflanze, die die ersten Symptome der Krankheit zeigt, aus dem Boden, so erkennt man äußerlich der Wurzel anhaftend und diese gleichsam umspinnend, vor allem an den oberen Teilen der Pfahlwurzel, zarte Fäden, die meist weißlich, manchmal auch leicht gebräunt erscheinen. Ich habe die Erfahrung gemacht, daß dieses außerordentlich feine, flockige

Hyphengeflecht sehr luftempfindlich ist und beim Ausheben der Wurzel sofort kollabiert. Es kommt für eine genauere Untersuchung daher leider kaum



Abb. 6. *Rosellinia quercina*. Rhizoctonienstränge auf der Wurzeloberfläche (etwa 15fach)

in Frage. Diese Hyphen verbreiten sich in den oberen Bodenschichten und tragen die Krankheit von Pflanze zu Pflanze.

Spült und reinigt man die Wurzel vorsichtig von den anhaftenden Erdteilchen, so erkennt man, reichlich vor allem an den im Spätsommer dem Boden entnommenen Eichen, weitere Anzeichen der Krankheit: Eng der Wurzel angepreßt und bei oberflächlichem Be-

trachten wie Reste abblättrender Rindenschuppen wirkend (Abb. 6), findet man unregelmäßige, flächige, braune Myzelbänder, die zuweilen fein, meist aber relativ breit der Wurzel aufkleben und sich stark verästeln. HARTIG spricht von zwirnsfadenähnlichen Rhizoctonien; nach meinen Beobachtungen trifft der Ausdruck „zwirnsfadenähnlich“ nur in seltenen Fällen zu. Was weiterhin an Merkmalen der Krankheit dem bloßen Auge sichtbar ist, sind braunschwarze, stecknadelkopfgroße Erhebungen, auffallend vor allem am Wurzelhals, wo die Rinde oft davon übersät zu sein scheint. In ihrer Umgebung ist die Rinde häufig geschwärzt und löst sich leicht ab. Aber auch an den unteren Teilen der Pfahlwurzel findet man viele dieser schwarzen Knöllchen, meist in der Nähe der Ansatzstellen der Seitenwurzeln, welche nicht selten abgestorben und verfault sind. Abb. 7 zeigt zwei dieser Knöllchen, die HARTIG als Sklerotien bezeichnet, stärker vergrößert. Man sieht sie in der Rinde liegen, umgeben von der aufgebogenen Borke, und man gewinnt augenblicklich den Eindruck, daß es sich hier um Lenticellen handeln könnte, in die die Sklerotien wie eingebettet sind. Diese Vermutung wird bestärkt durch die Feststellung, daß an solchen Stellen keine Korkwarzen zu finden sind.

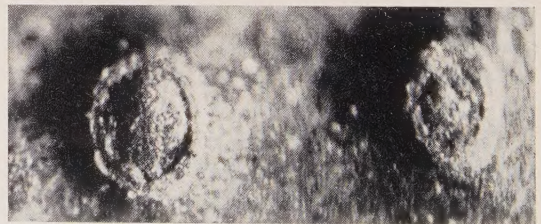
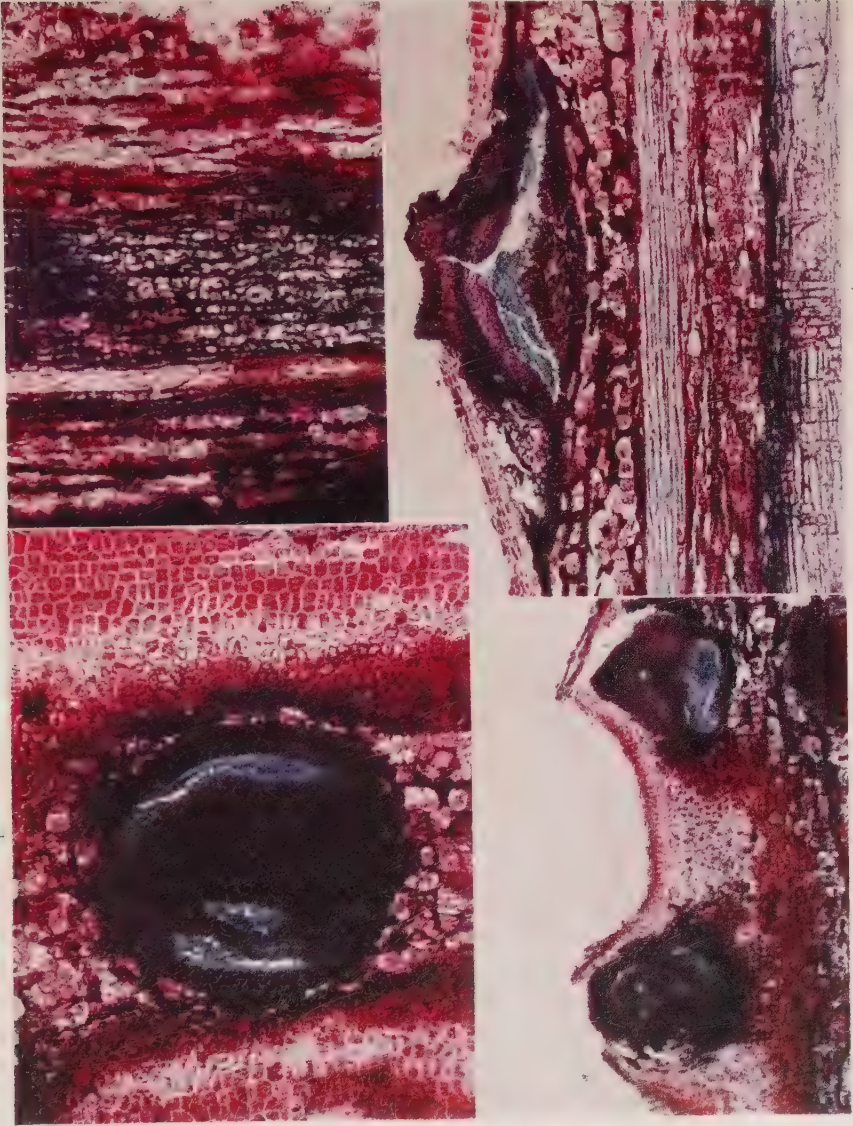


Abb. 7. *Rosellinia quercina*. Sklerotien in der Wurzelrinde der Eiche (etwa 100fach)

Rosellinia quercina

1. Sklerotium in der Wurzelrinde der Eiche (tang.)
2. Fächerförmig sich ausbreitende Hyphen in der Rinde (tang.)
3. Sklerotien in der Wurzelrinde der Eiche. Rechtes Sklerotium mit Infektionskeil (radial)
4. Auskeimendes Sklerotium in der Wurzelrinde (längs)

Bild 1 und 4 ca. 180fach vergrößert,
Bild 2 und 3 ca. 150fach vergrößert

Besonders gut läßt sich die Verbreitung und Verteilung der Sklerotien an in Wasser gestellten Pflanzen beobachten. Sorgt man dafür, daß die durchschnittliche Tagestemperatur etwa 20°C beträgt, so sieht man schon nach 24 Stunden, auch bei Wurzeln, die schon längere Zeit vertrocknet sind, aus den Sklerotien ein Büschel weißer Hyphen hervorbrechen. Das Myzel wuchert dann lebhaft und bildet in mit Feuchtigkeit gesättigter Luft ein dichtes, weiß-graues, schimmelartiges Gewebe, das sich auch auf den Wandungen des Kulturgefäßes radial verbreitet. (Dasselbe Bild findet man zuweilen in der Grasnarbe der infizierten Pflanzgärten bei feuchtem Wetter.) Bei Pflanzen, deren Wurzelspitze oder Seitenwurzeln abgestorben sind, bricht aus diesen ebenfalls ein weißes Myzelbüschel hervor. Aus einer gesunden Wurzelspitze bzw. aus gesunden Seitenwurzeln sah ich niemals sich Pilzhypen entwickeln. Dagegen wurden sie besonders stark von Myzel umspinnen.

3. Mikroskopische Untersuchungen

Betrachten wir zuerst einige Schnitte durch das Periderm einer von *Rosellinia* befallenen Eichenwurzel. Die die Rinde äußerlich bekleidende Zellschicht ist an den Stellen, wo ihr ein Rhizoctonienstrang aufliegt, stark zersetzt. Zahlreiche Pilzhypen durchwachsen regellos die oberste Schicht der Borke. Nach HARTIG sondern die Rhizoctonien, die aus unregelmäßig sich kreuzenden Hyphen bestehen, eine Art Schleim ab, der mittels seiner chemischen Eigenschaften die obersten Zellen zersetzt. Ihre Inhaltstoffe dienen der Ernährung des Pilzes, solange dieser die Wurzel innerlich noch nicht infiziert hat. Die Absonderungen sind auch der Grund für die oben erwähnte innige Verbindung zwischen Wirtspflanze und Parasit.

Legt man einen Tangentialschnitt so an, daß er ein Sklerotium in der Mitte durchschneidet und auf diese Weise die Peridermschicht in etwas tieferen Lagen getroffen wird, so stellt man fest, daß selbst bei dieser stark befallenen Wurzel die verkorkten Zellen ein völlig normales Aussehen haben, d. h. sie zeigen an keiner Stelle Pilzhypen, noch sind sie in irgendeiner Weise durch toxische Substanzen angegriffen. Das zeigt, daß der Pilz zwar die Fähigkeit besitzt, die oberste Schicht der verkorkten Zellen zu zersetzen; zu durchdringen vermag er das Periderm jedoch nicht, das schon bei der jungen Eiche aus sehr fest aneinanderliegenden Zellen aufgebaut ist und keine Lücken freiläßt. Die Inhaltstoffe der verkorkten Zellen, die durch ähnliche Derivate von Gerbstoffen wie die der Kernhölzer gebildet werden, wirken antiseptisch und bedingen die große Widerstandsfähigkeit der Borke (STRASBURGER 1953). Sie bietet somit der Pflanze auch Schutz gegen das Eindringen von Fremdkörpern.

a) Infektion von Wurzelspitzen

Wie kommt nun eine Infektion zustande? Um den Angriff auf die Wurzel zu verstehen, möchte ich kurz an die Stellen erinnern, die keinen geschlossenen Korkmantel besitzen. Da ist einmal die Spitze der Pfahl-

wurzel, die bis zu einem gewissen Altersstadium unverkorkt ist und dem Parasiten keinen Widerstand entgegenzusetzen vermag. Gelangt daher das Myzel an die Spitze der Pfahlwurzel, bevor deren äußeres Rindengewebe durch die Entstehung eines inneren Periderms abgestorben ist, so durchbohren die Hyphen die Zellwände und bringen die Wurzel zum Absterben. In der Tat wird die Wurzelspitze in vielen Fällen zuerst getötet, ja oft stirbt sie allein ab. Andererseits findet man auch gesunde Wurzelspitzen an erkrankten Pflanzen, besonders bei zwei- und dreijährigen Eichen, deren Wurzeln wesentlich länger sind als diejenigen einjähriger Pflanzen. Der Parasit scheint die der Erdoberfläche nahen Bodenschichten zu bevorzugen; in die tiefer gelegenen dringt er nur selten vor. Bei den Faserwurzeln finden wir ähnliche Verhältnisse wie bei der Pfahlwurzel. Sie sind so lange ohne schützende Korkhülle, bis eine innere Peridermbildung eintritt und können von dem umspinnenden Myzel leicht abgetötet werden. Daß dies nicht regelmäßig der Fall ist, sondern nur unter für den Pilz günstigen Umständen, beweisen viele gesunde Seitenwurzeln einer erkrankten Pflanze. Querschnitte durch die Wurzelspitzen kurz vor der Entstehung des Periderms zeigen, daß der Pilz bis zu diesem Zeitpunkt nur selten in der Lage ist, bis in den zentralen Teil der Wurzel vorzudringen. Nur die äußeren Zellen des saftigen Rindenmantels, der kurz darauf abgestoßen wird, sind vom Pilz infiziert.

b) Infektion durch die Basis von Seitenwurzeln?

Eine weitere Angriffsstelle soll nach HARTIG dort sein, wo die Seitenwurzeln den Rindenmantel der Hauptwurzel durchbrechen und somit „die Entstehung der Korksicht durch die endogen entwickelte Wurzel verhindert war“. Ich habe an gesunden Wurzeln die Ausbruchsstelle der Seitenwurzel daraufhin studiert. Soweit man dies bei den durch die Abbiegung der Seitenwurzel bei ihrem Austritt schwierig anzufertigenden Schnitten einwandfrei beobachten kann, konnte ich keine Stelle finden, die einen regelmäßigen Durchtritt beweisen würde. TSCHERMAK-WOESS und DOLEZAL (1953) haben bei anderen Objekten diese Frage genauer untersucht und festgestellt, daß eine Wirkung der endogen entstehenden Seitenwurzelanlage auf die benachbarten Dauergewebe in der Art stattfindet, daß frühzeitige Mitosen und Zellteilungen eintreten, die die durch den Durchbruch der Seitenwurzel hervorgerufene Wundstelle im Rindengewebe der Hauptwurzel verschließen. Diese Teilungen sind nicht erst als Folge eines Wundreizes beim Durchbruch anzusehen, denn schon während der ersten Teilungen im Perizykel laufen auch Mitosen in der Rinde ab.

Anders mögen die Verhältnisse bei abnormer Witterung, d. h. bei allzu großer Bodenfeuchtigkeit liegen. Wie wir wissen, findet bei allen Wurzeln unserer Bäume ein ständiger Umbau des Wurzelwerkes statt. Wurzeln sterben ab, andere werden neu gebildet. Treten nun abnorme Bodenverhältnisse ein, so hat die Pflanze nicht die Möglichkeit, den normalerweise gewährleisteten Wundverschluß rechtzeitig zu bilden. Der Pilz hat dann leichtes Spiel. Ich nehme daher an, daß die bei HARTIG beobachteten Infektionen an den Ansatzstellen der Seitenwurzeln zum Teil auf

einer Art Wundinfektion beruhen. HARTIG selbst schreibt ja, daß eine solche Infektion stets bei abgestorbenen Seitenwurzeln stattgefunden habe. Wären undichte Stellen anatomisch bedingt, so müßte ein Befall ja ebenso häufig an gesunden Seitenwurzeln zu beobachten sein.

Obwohl ich demnach diesen Infektionsweg in erster Linie nicht für anatomisch bedingt halte, möchte ich kurz darauf eingehen: In der Tat findet man häufig Sklerotien an den Ansatzstellen abgestorbener Seitenwurzeln. Äußerlich meist nicht sichtbar, zeigen diese Sklerotien ein völlig anderes Aussehen als diejenigen, die ich in der Folge beschreiben werde. Unmittelbar unter der Borke oder auch ihr eingelagert, meist ohne sichtbare Durchbruchsstelle nach außen, finden wir eine Art Dauermyzel. Die Hyphen, die durch einen Wundriß in das Innere der Wurzel hineingewachsen sind,

dringen von Zelle zu Zelle vor, schwellen im Innern zu zahlreichen runden Hyphengliedern an, und jede blasig erweiterte Zelle zeigt in der Mitte einen Fetttropfen (Abbildung 8). In solchen Rindenzellen, die ganz mit Dauermyzel erfüllt sind, erhalten die einzelnen Hyphenglieder eine polyedrische Gestalt. Die Wandungen der Wirtszellen bleiben dabei vollständig erhalten und bilden

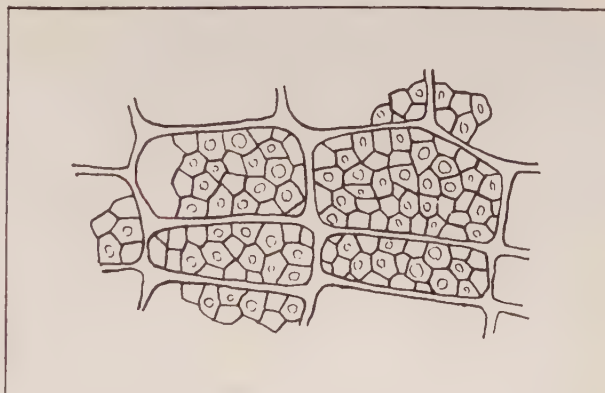


Abb. 8. *Rosellinia quercina*. Wirtszellen aus einem gefächerten Sklerotium, mit polyedrisch abgeplatteten Hyphen erfüllt (halb schematisch, etwa 1000fach)

ein gefächertes Sklerotium. Die am weitesten innen gelegenen Dauermyzelien verwandeln sich in einem für den Parasiten günstigen Augenblick in normale Hyphen, die nun ihrerseits in alle Richtungen vordringen und das Gewebe zerstören. Die auf diese Weise entleerten Zellen zeigen später stets eine große Zahl Kristalldrüsen von oxalsaurem Kalk. Die gleichen Kristalldrüsen findet man als typisches Merkmal der Krankheit in allen zerstörten Gewebepartien des Bastkörpers. Hyphenknäuel bzw. Zapfen, wie ich sie später beschreiben werde, sah ich an den Durchbruchstellen der Seitenwurzeln niemals eindringen. Wohl aber fand ich unter den Originalpräparaten von HARTIG, in deren Besitz sich unser Institut befindet, dasjenige, nach welchem HARTIG augenscheinlich die Zeichnung angefertigt haben muß, die man in allen seinen Lehrbüchern bzw. bei den Autoren kopiert findet, die die von HARTIG angestellten Untersuchungen zitieren. Ich habe eine Photographie dieses Präparates angefertigt (Abb. 9). Leider besaß es nicht die geringsten Farbkontraste mehr, was leicht verständlich ist, wenn man bedenkt, daß dieses Präparat bereits mehr als 70 Jahre alt ist. Trotzdem erkennt man gut, daß sich oberhalb und



Abb. 9. *Rosellinia quercina*. Infektionsknollen ober- und unterhalb einer ausbrechenden Seitenwurzel in das Wirtsgewebe eindringend. (Längs, etwa 60fach. Nach einem Präparat von ROBERT HARTIG)

unterhalb der ausbrechenden Seitenwurzel je ein breiter Infektionskeil zwischen das Gewebe des Wirtes drängt und dieses scheinbar mechanisch auseinanderschiebt. Die obere Knolle bildet gleichzeitig einen nach außen auswachsenden Hyphenstrang. Aus dem Infektionsknäuel bildet sich dann später ein Sklerotium, wie ich es unten näher besprechen werde. Ob HARTIG zahlreiche dieser Infektionsstellen in so anschaulicher Weise präpariert hat, darüber wage ich nicht zu urteilen. Nur dieses eine unter der Vielzahl von Präparaten, die ich aus dieser Zeit fand, zeigte eine derartige Infektion an einer Seitenwurzel. Ich habe lange nach einem ähnlichen Befallsbild gesucht, leider ohne Erfolg, so daß ich vermute, daß es sich dabei um ein außerordentlich eindrucksvolles, nicht aber um das so dargestellte Muster-

beispiel für die Infektionsweise von *Rosellinia quercina* handelt. Der Hauptinfektionsweg scheint mir vielmehr der durch die Lenticellen zu sein, und ich möchte diesen Weg anschließend eingehend schildern.

c) Infektion durch die Lenticellen

Betrachten wir noch einmal eine infizierte Eichenwurzel, so stellen wir fest, daß die Mehrzahl der Sklerotien an anderen Stellen zu finden sind als eben beschrieben. Es muß also noch andere Stellen auf der Oberfläche der Wurzelrinde geben, die ebenso, wie die vorher geschilderten, keinen geschlossenen Korkmantel besitzen. Was mir dabei schon zu Beginn meiner Untersuchungen auffiel, war, daß die Sklerotien fast ausschließlich links und rechts neben den Durchbruchstellen der Seitenwurzeln auftraten, nicht jedoch, wie HARTIG angibt, ober- und unterhalb derselben. Sie befinden sich jedoch in fast allen Fällen nicht unmittelbar an den Austrittsstellen selbst, sondern in einem gewissen, sehr geringen Abstand von jenen entfernt. Diese Verteilung war so auffallend, daß ich gesunde Eichenpflanzen zum Vergleich vornahm. Es stellte sich heraus, daß stets auf beiden Seiten der Seitenwurzeln eine Lenticelle zu finden ist.

Auf Abb. 10 ist eine solche Lenticelle neben der Ansatzstelle einer Seitenwurzel abgebildet. Wie auch WURTZ (1953) schreibt, neigt das Füllgewebe der Lenticellen der Eiche dazu, mehr oder weniger stark zu verkorken. Es entsteht jedoch ein Spalt zwischen den verkorkten Zellen, der bis zum Parenchym des Bastkörpers reicht und somit die Aufgabe der Lenticelle erfüllt. Die Pflanze entbehrt also an dieser Stelle der sonst lückenlosen, schützenden Korkschicht und kann sich dem Angriff des Parasiten nicht zur Wehr setzen. Die Versuche von SATIN (1922) bestätigten meine Vermutung, daß eine Infektion durch die Lenticellen möglich und in verschiedenen Fällen beobachtet worden sei.

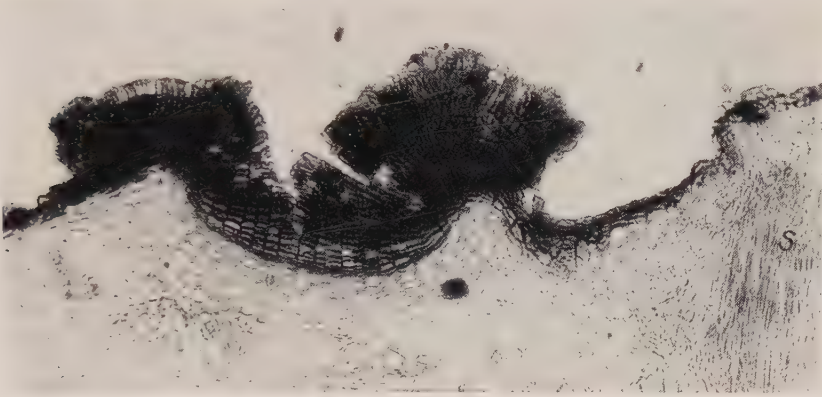


Abb. 10. *Rosellinia quercina*. Gesunde Lenticelle neben der Durchbruchstelle einer Seitenwurzel (s) (quer, etwa 150fach)

Ich zitiere: „Es lag nahe zu vermuten, daß die Lenticellen unter gewissen Umständen als Eintrittspforten für parasitische Pilze dienen, ebenso wie ja bekanntlich auch Spaltöffnungen für gewisse Rostpilze und Erysipheen in Betracht kommen. Die Vermutung gewinnt an Wahrscheinlichkeit, wenn man beobachtet, daß parasitische Pilze die Lenticelle als Durchbruchstelle für die Fruchtkörper benutzen. In sehr auffallender Weise zeigt sich dies bei *Valsa massaria* auf *Sorbus aucuparia*, wo an stark befallenen Zweigen keine Lenticelle verschont bleibt ... Versuche wurden bei *Nectria cinnabarina* auf Ahorn und Roßkastanie angestellt. Die Wirtspflanzen wurden in einem Gewächshaus längere Zeit in feuchter Luft gehalten, und sodann, wenn die Lenticellen sich geöffnet haben und beginnen, Aerenchym zu bilden, mit wäßrigen Aufschwemmungen der Konidien bestrichen. Vorausgesetzt, daß die Luftfeuchtigkeit hinreichend groß war, keimten die Konidien gut, und es konnte bald — an mikroskopischen Schnitten — das Einwachsen der Keimschläuche in die Lenticellenhöhlung beobachtet werden. Wo die Infektion gelang, zeigte sich ein sehr schnelles Absterben der Rinde in ziemlich großer Ausdehnung ... Mikroskopische Untersuchungen zeigten in allen Fällen, daß die letale Wirkung von den mit Konidien bepinselten Lenticellen ausgegangen war, und zwar muß es ein sehr schnell diffundierendes und außerordentlich heftiges Gift sein, das von dem in dem Lenticellenkrater sich entwickelnden *Nectriamyzel* ausgeschieden wird, denn unter den bepinselten Lenticellen zeigte sich eine bogenförmig begrenzte Zone sehr stark gebräunter Rindenzellen ...“

HARTIG berührt ebenfalls das Problem einer Lenticelleninfektion, geht aber nicht näher darauf ein.

Er schreibt: „Nur sehr selten sieht man Infektionsstellen an solchen Punkten auftreten, wo keine Seitenwurzeln entsprungen sind und liegt zunächst die Vermutung nahe,

daß Lenticellen dem Parasiten den Eingang gestattet haben, um so mehr, als am Stengel die Lenticellen das Eindringen des Parasiten allein ermöglichen¹⁾.

Ich begnügte mich nun keineswegs mit diesen ersten Anhaltspunkten, sondern war bemüht, ohne vorgefaßte Meinung nach noch früheren Infektionsstadien zu suchen.

Die Rhizoctonienstränge, die der Wurzel aufliegen, zerstören, wie schon anfangs erwähnt, nur die oberste Zellschicht und vermögen nicht, in das Innere der Wurzel einzudringen. Gelangt nun ein solcher Strang in die Nähe einer Korkwarze, so wachsen die Hyphen in ihren Spalt hinein. Meist zeigen die Lenticellen durch die erhöhte Bodenfeuchtigkeit (nur bei einer solchen ist, wie ich anfangs erwähnte, *Rosellinia quercina* stark pathogen) im Befallsstadium außer den verkorkten Zellen der Abb. 10 eine Reihe lockerer Füllzellen (Abb. 11). Diese Füllzellen stellen ein sogenanntes „hyperhydrides Gewebe“ dar (KÜSTER 1925). Es sind Wucherungen, die durch Hypertrophieren sämtlicher Phellodermis-schichten entstehen, indem sich die Zellen zu rundlichen, dünnwandigen, farblosen Zellen vergrößern und große Interzellularräume zwischen sich freilassen. Stellenweise geben die Zellen sogar jede feste Verbindung untereinander auf. Ich nehme an, daß diese Aerenchymbildung²⁾ Vorbedingung für eine starke Infektion durch *Rosellinia quercina* ist. Die Hyphen durchwachsen die lockeren Zellen, ernähren sich von ihrem reichlichen Zellsaft und bilden schließlich ein dichtes Hyphenknäuel im Innern der Lenticelle. Das Rindengewebe in

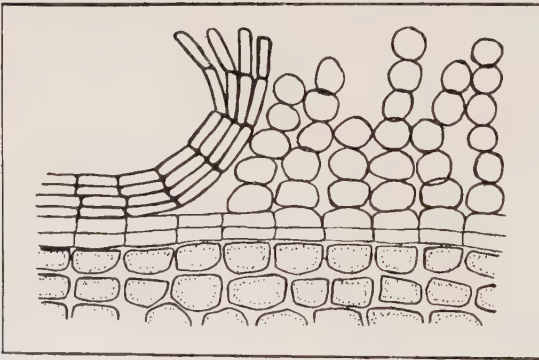


Abb. 11. *Rosellinia quercina*. Lenticelle mit Aerenchym (halb schematisch, etwa 300fach)

ihrer Umgebung fängt in diesem Stadium an, sich zu bräunen. Eine Giftwirkung scheint dem Vordringen des Pilzes in den Bastkörper vorauszugehen. Die Widerstandskraft der lebenden Parenchymzellen erschlafft dadurch frühzeitig, und der Parasit hat leichtes Spiel. Abb. 12 zeigt einen aus Hyphen gebildeten Zapfen in einer Lenticelle. Durch die relativ große Dicke des Schnittes sind die aufgebogenen Korkschichten nur schwer zu erkennen. Bei der Anfertigung dünner Schnitte wird die nur sehr locker im Wirtsgewebe befestigte Infektionsknolle stets herausgerissen. Der Bastkörper ist in diesem Stadium noch unverpilzt.

¹⁾ In seltenen Fällen, d. h. bei besonders hoher Grasnarbe in den Pflanzgärten, in der das Myzel bei großer Feuchtigkeit zuweilen wuchert, kann nach HARTIGS und meinen Beobachtungen auch eine Infektion an oberirdischen Pflanzenteilen stattfinden.

²⁾ SCHENCK, GOEBEL und TUBEUF rechnen das wuchernde Lenticellengewebe zum Aerenchym, während KÜSTER von aerenchymähnlichem Gewebe spricht.

Nicht immer findet man diese Infektionszapfen. In den meisten Fällen sammelt sich in der aufgetriebenen Lenticelle eine große Zahl Hyphen an, die die anwesenden Zellen nicht wie auf Abb. 12 auseinanderdrücken, sondern dieselben durchwachsen und zersetzen. Treten nun für den Parasiten ungünstige Verhältnisse ein, so bleibt der Myzelknäuel im Ruhezustand, und die Eiche gewinnt Zeit, auf der Grenze der intakten Gewebe eine schützende Korkschicht zu bilden. Bleiben die Verhältnisse günstig, so bildet das Myzel eine feste Knolle, die sich nach außen mit einer dunklen Rinde aus eng aufeinanderliegenden, verschlungenen Hyphen aufbaut und das regellos verfilzte innere Gewebe umhüllt. Gleichzeitig mit der Entstehung eines solchen Sklerotiums geht die Besiedlung der Wirtspflanzen vor sich. Denn hat das Myzel an einer Stelle festen Fuß gefaßt, so werden von dem unteren Rand des Hyphenknäuels aus Myzelfäden in den inneren Bastkörper geschickt. Die Hyphen beginnen zu sprossen, und während sie Bast und Holz zersetzen, dienen die hierbei freiwerdenden Nährstoffe der Entstehung des Fortpflanzungsorganes.

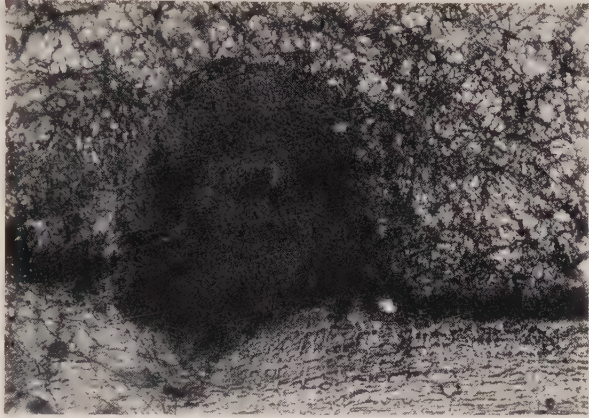


Abb. 12. *Rosellinia quercina*. Die Pilzhypen haben sich in einer Lenticelle zu einem Infektionsknäuel verdichtet und dringen keilförmig in das Wirtsgewebe vor (längs, etwa 120fach)

In welcher Weise dringt nun der Pilz weiter vor? Farbtafel I, 2, zeigt einen Tangentialschnitt, der etwas unterhalb von I, 1 getroffen ist. Vom unteren Rande des Sklerotiums breitet sich ein dichtes Myzelnetz nach allen Richtungen hin fächerförmig aus (durch die Krümmung ist auf dem Schnittbild nur die Längsausbreitung sichtbar). Auf Tafel I, 3 sieht man dasselbe im Radialschnitt: von den zwei Sklerotien hat das linke noch keine Hyphen ausgesandt; das rechte dagegen bildet einen Infektionskeil aus vielen Einzelhyphen bestehend, der sich einerseits zwischen Korkschicht und Parenchym schiebt (links unten), andererseits durch die innere Bastregion bis in die kambiale Zone vordringt (rechts), die Substanz beider Gewebe auflösend und zerstörend. Im Kambium breitet sich der Pilz meist am heftigsten aus, und die Zersetzung ist an dieser Stelle daher am weitesten fortgeschritten (Tafel I, 4). Das Resultat ist ein schon anfangs erwähntes leichtes Ablösen der Rinde. Von der Kambialregion aus zerstört der Pilz in kurzer Zeit alle Gewebe: er gelangt in die Gefäße und das Holzparenchym, zersetzt den Holzkörper, der bald durchgehend weißfaul wird.

Da in den Wurzeln der Eiche keine Kernholzbildung erfolgt, kann der Pilz in alle Organe des Holzes vordringen. Dies geschieht auf dem Wege über die Markstrahlen, die oft von weißem Myzel ganz erfüllt sind, das sich später braun färbt und schon bei einer Betrachtung des Wurzelquerschnittes mit bloßem Auge auffällt.

Unter günstigen Bedingungen keimen die Sklerotien auch nach außen hin aus. Unter allmählicher Auflösung des Gewebes schreitet die Umwandlung in Rhizoctoniafäden fort, welche nach dem Aufplatzen der Außenwand büschelförmig zum Vorschein kommen. Tafel I, 4, zeigt ein Sklerotium, welches auszukeimen beginnt (vgl. auch Textabb. 9). Bast- und Holzkörper sind in diesem Stadium bereits stark geschädigt.

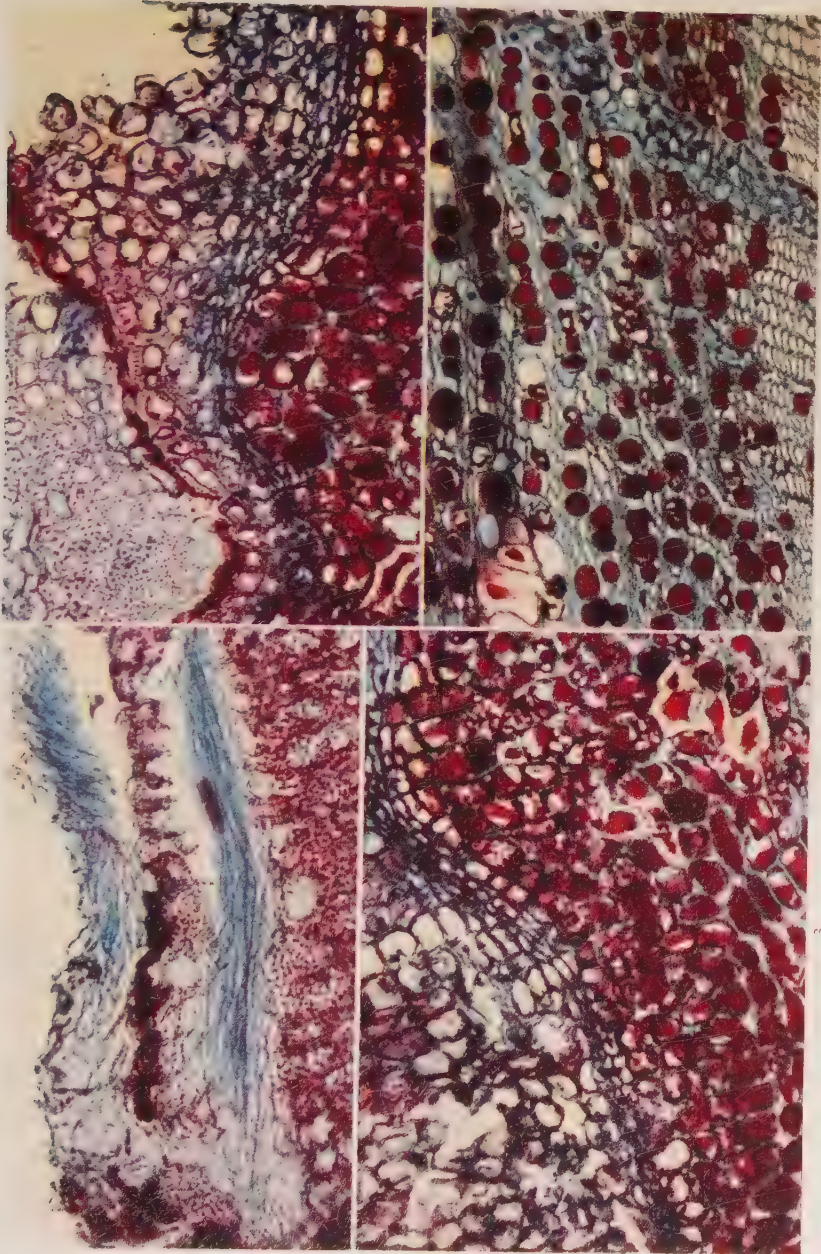
Wie schon oben beschrieben, sind die Sklerotien sehr widerstandsfähig gegen Austrocknen und keimen noch nach langer Zeit. Sie bilden damit ein wichtiges Fortpflanzungsorgan für den Parasiten. Wir sehen also, daß die Lenticellen sowohl die Eintritts- wie auch die Austrittspforten für *Rosellinia quercina* darstellen. Sie bilden zwar nicht den einzig möglichen Infektionsweg, wie es die Wurzelhaare der Orchideen für die Mykorrhizapilze tun, stellen aber das privilegierte Befallsorgan für diese Krankheit dar.

d) Andere Infektionsweisen

Neben der eben beschriebenen Eindringungsweise gibt es noch einige Abwandlungen derselben, von denen ich der Klarheit halber nicht allzu ausführlich berichten möchte. So können sich z. B. einige Hyphen durch die oberste Korkzelllage an einem beliebigen Punkt hindurchbohren und diese Zellschicht dann von der darunterliegenden abdrücken. Es entsteht so ein Pseudosklerotium, das meist außerordentlich schmal ist, und dessen Hyphen keine dunkle Rinde bilden, so daß sie im Präparat stets hellblau gefärbt erscheinen. Auf die gleiche Weise kann in der Rinde auch ein gefächertes Sklerotium entstehen, wie ich es oben beschrieben habe, ohne daß eine Lenticelle befallen wird. Diese Sklerotien sind jedoch nur für einjährige Eichenpflanzen, deren Korkhaut noch sehr dünn ist, eine Gefahr. Da sie stets in den Korkmantel eingelagert sind, können ältere Pflanzen nicht infiziert werden.

4. Zusammenfassung

Zusammenfassend hebe ich noch einmal hervor: *Rosellinia quercina* besitzt nicht die Möglichkeit, die Korkhaut der Wurzel unmittelbar zu durchstoßen. Sie ist vielmehr auf anatomisch vorgebildete Infektionswege angewiesen, d. h. auf Stellen, die keinen geschlossenen Korkmantel besitzen. Diese Organe sind die Lenticellen, die in der Tat so stark befallen werden, daß man bei einer heftigen Infektion keine gesunde Lenticelle mehr findet. Neben diesen Durchlaßstellen dienen auch Wunden, wie sie beim Absterben von Seitenwurzeln entstehen können, und die Wurzelspitzen, bevor das Periderm gebildet wird, als Eintrittspforten für den Parasiten. Welche Vorbedingungen für eine Infektion überhaupt gewährleistet sein müssen, werde ich am Schluß dieser Arbeit diskutieren.



1. Breite Myzelbänder zwischen den Borkenschuppen der Fichtenwurzel (längs)

2. Verpilzte Lenticelle in der Fichtenrinde (quer)

3. Die Parenchymzellen unterhalb des Lenticellenkambiums sind durch Fermenteinwirkung des Parasiten stark geschädigt (quer)

4. Außer einigen verharzten Parenchymzellen befindet sich das Bastgewebe in der Nähe des Kambiums in gesundem Zustande (quer)

Alle vier Bilder ca. 180fach vergrößert

C. *TRAMETES RADICIPERDA* AN FICHTE

1. Spezielle Methodik

Die nachfolgenden Untersuchungen wurden an rotfaulen Fichten eines etwa 50 Jahre alten Bestandes vorgenommen. Von Wurzeln verschiedener Stärke und unterschiedlichem Befall wurden Rindenproben entnommen. Die Wurzelrinde gesunder Fichten diente stets zum Vergleich. Stark befallenes Material wurde in Zelloidin eingebettet, da sich die Borkenschuppen außerordentlich leicht ablösen. Die gesunden und leichter infizierten Rinden wurden teils frisch, teils nach einer Fixierung mit Bouin oder Formol geschnitten. Schnitte durch alle drei Achsen erwiesen sich für genaue Beobachtungen als vorteilhaft. Die Färbung nach CARTWRIGHT war nicht in allen Fällen günstig. Die geschädigten Korkzellen färbten sich meist blaßrosa oder bräunlich, zuweilen nahmen sie gar keine Farbe an. Nur in wenigen Fällen zeigten sie nach der Färbung den charakteristischen Safraninton. Die Pilzhyphe nahmen normalerweise eine intensiv blaue Farbe an; diejenigen im Innern der verkorkten Peridermzellen jedoch wiesen nach einer Behandlung mit Anilinblau nicht die geringste Färbung auf. Durch die doppelte Konturierung und die charakteristischen Formen waren sie jedoch bei stärkster Vergrößerung von ihrer Umgebung leicht zu unterscheiden.

Um die Hyphen stärker hervorzuheben, wurden andere Färbemittel ausprobiert. Rutheniumrot gegengefärbt mit Gentianaviolett (SCHNEIDER-ZIMMERMANN, S. 262) erwies sich in einzelnen Fällen als sehr eindrucksvoll. Die Hyphen hoben sich hierbei zwar nicht durch einen scharfen Farbkontrast von den Korkzellen ab, aber die Konturierung wurde außerordentlich deutlich (Abb. 16). Überdies färbte sich die Mittellamelle intensiv lila im Gegensatz zu den schwach gefärbten sekundären Zellwänden; auf diese Weise ließ sich die Perforation der Membranen deutlich erkennen (Abb. 15). Die Frage, ob es sich bei der Borke rotfauler Fichten um eine Perforation der Membranen oder um Tüpfel handelt, wurde auch mit Hilfe des Phasenkontrastmikroskopes untersucht. Dabei sollen Tüpfel im Dunkelfeld durch das Vorhandensein der Mittellamelle hell aufleuchten, während Löcher dunkel erscheinen (FREY-WYSSLING 1952). Die Untersuchungen erwiesen sich als unbefriedigend.

2. Bisherige Literatur

Trametes radiciperda, auch *Polyporus annosus* oder *Fomes annosus* genannt, gehört zur Familie der Polyporaceen (*Polyporales*) (GÄUMANN 1926). Der Pilz lebt saprophytisch im Boden und infiziert von dort aus Nadelhölzer aller Art, vor allem Fichtenbestände jeden Alters, an denen er die allbekannte und gefürchtete Rotfäule verursacht. Die Infektion erfolgt an den Wurzeln. Das Myzel verbreitet sich aufwärts und abwärts, das befallene Gewebe tödend. Die Zellwände werden aufgelöst, und das Holz nimmt je nach dem Grad der Zersetzung verschiedene Farbe an: im ersten Stadium grau bis violett, dann zerfällt das Holz entlang der Jahrringgrenzen in Schalen, die Hauptmasse ist rotbraun gefärbt, dazwischen können schwarze Flecke verschiedener Größe eingestreut sein, die von einem weißen Hof umgeben sind (NEGER 1919). Zuletzt, bei weit fortgeschrittener Zersetzung, zerfällt das Holz in morsche, faserige Massen, die, solange sie feucht sind, schwammige, jauchenhafte Beschaffenheit haben. Dabei schreitet die Infektion von innen nach außen vor; sie zersetzt zuerst das Stamminnere, dann zuweilen auch den Splint. Das Myzel und die Fäulnis steigen gewöhnlich etwa drei Meter oder auch höher im Stamm empor, ihn innerlich bis zur vollständigen Aushöhlung auflösend. Die eingewachsenen Hornäste bleiben dabei unversehrt. Auch die äußeren Splintlagen können dem Pilz dauernd widerstehen. An

der befallenen Stelle tritt oft ein verstärkter Kambialzuwachs ein, so daß das befallene Stockende alter Bäume angeschwollen erscheint. Kurz vor dem Absterben des Baumes erfolgt eine allgemeine Nadelschütte und ein starker Harzausfluß im unteren Teil des Stammes. Die Fruchtkörper erscheinen gleichzeitig besonders am Wurzelanlauf oder an frei oder hohl liegenden Wurzeln. Sie sind tellerförmig ausgebreitet und liegen der Wurzel eng an. Oberflächlich erscheinen die älteren Fruchtkörper braun, die jungen reinweiß bis gelblich.

Die Frage, wie und unter welchen Voraussetzungen eine Infektion durch *Trametes radiciperda* zustande kommt, hat eine große Zahl Autoren beschäftigt. Erwähnen möchte ich hier vor allem HARTIG, SORAUER, HOPFFGARTEN, RENNERFELT und BOYCE. Eine einwandfreie Beweisführung über die Infektionsweise fehlt jedoch bisher vollständig.

Wohl der erste, der sich mit dem Wesen der Destruktionsfäule im allgemeinen und dann auch speziell mit den Zersetzungserscheinungen des Holzes durch *Trametes radiciperda* befaßte, war Robert HARTIG. Er gibt eine genaue Beschreibung der Vorgänge, die beim Abbau der Zellwände stattfinden, und berichtet eingehend von den äußeren Erscheinungen, die er an rotfaulen Fichten beobachtet hat. Über die Infektionsweise als solche nimmt er an, daß sie durch Wundstellen, vielleicht auch durch Berührung kranker Wurzeln mit denen gesunder Bäume zustande kommt; er geht jedoch nicht näher auf diese Frage ein. BODEN untersuchte dann 1904 die Harzbeulen der Fichtenwurzeln und vermutete schließlich, daß das in zusagenden Böden überall verbreitete Myzel abgestorbene Wurzeln als Eingangspforte benutzt, eine Ansicht, die sich seither das gesamte forstpathologische Schrifttum zu eigen gemacht hat. Die Möglichkeit einer Übertragung durch Wurzelberührung oder Wurzelverwachsung lehnt er vollkommen ab. Daß das Absterben der Wurzeln in den verdichteten Böden eine Rolle bei der Infektion spielen muß, geht ebenfalls aus den Arbeiten von ALBERT (1907) hervor. MATTHES wies 1911 auf das horstweise Auftreten von Engerlingen auf Ackeraufforstungen hin und sah die Verwundungen der auf Feldböden vornehmlich flachstreichenden Wurzeln als Eingangspforten für *Trametes radiciperda* an.

HOPFFGARTEN schreibt 1933: „Es zeigte sich, daß die erkrankten Wurzeln in einer Schicht von 15 bis 30 cm unter der Bodenoberfläche lagen. In der obersten Bodenschicht oder im Humus finden sich an erkrankten Bäumen oft noch sehr viele gesunde Wurzeln von geringer Stärke, die zuweilen noch weit in die Sterbelücken hineinreichen, ohne irgendwie Verwundungen, Infektionsstellen oder abgestorbene Teile zu zeigen. Neben diesen findet man häufig solche mit Trittwunden, an denen eine Infektion stattgefunden hat. Aber es läßt sich vom äußeren Augenschein nicht feststellen, ob es sich um *Trametes radiciperda* handelt, und zumeist ist die Infektionsstelle eng begrenzt, und das Myzel scheint nicht weiter in die Wurzel übergreifen zu können. ... Dem äußeren Anschein nach macht es immer wieder den Eindruck, als ob die Übertragung der Infektion von einer Wurzel zur anderen an Wurzelberührungen und Wurzelverwachungen vor sich ginge. Ich kann dafür aber keine exakten Beweise bringen ... Die Übertragung von einer Wurzel zur anderen setzt außerdem voraus, daß die neuangegriffene Wurzel auch für den Befall disponiert ist. Die gesunden Wurzeln der obersten Bodenschicht werden daher

dem Eindringen des Myzels Widerstand bieten, während die infolge der Verdichtung geschädigten oder gar schon abgestorbenen Wurzeln der Pflugsohlenschicht das Myzel leicht eindringen lassen. Die faulen Wurzeln der obersten Bodenschicht sind meist vom Stock her infiziert . . .“

BOYCE steht 1948 auf dem Standpunkt, daß nur selten ganz gesunde Bäume infiziert werden, während RENNERFELT 1949 diese Ansicht widerlegt, indem er sagt: „Experiments and observations have established that this fungus can spread by contact from the affected roots of one root system to the healthy roots of another tree.“ Er spricht sich damit für eine Kontaktinfektion aus, mit der Begründung, daß das Myzel nur mit Schwierigkeit in der Humusdecke wachsen kann, was in erster Linie wahrscheinlich auf der Konkurrenz seitens anderer Mikroorganismen, wie Bakterien und Schimmelpilzen, beruht. Im Wurzelsystem dagegen kann das Myzel von *Trametes radiciperda* leicht vordringen. Schließlich zitiere ich noch GÄUMANN, der sich 1951 in der letzten mir bekannten Veröffentlichung¹⁾ über diese Frage in folgender Weise äußert: „Fraß an Fichtenwurzeln durch Nagetiere und wohl auch Schälwunden an Stämmen durch Rotwild schaffen die Angriffstellen für den Erreger.“

Zusammenfassend ist festzustellen, daß alle Vermutungen über eine anatomische Lokalisierung der Eintrittspforten von *Trametes radiciperda* stets auf Wundstellen irgendwelcher Art oder auf Kontaktinfektion hinzielen. Andere Möglichkeiten wurden meines Wissens niemals erwogen. Bevor ich nun meinerseits die Frage diskutiere, ob der Befall von *Trametes* primär auf den vorhandenen Infektionswegen beruht oder ob es vorwiegend eine Frage der Disposition der Pflanze einerseits und der Bodenbeschaffenheit (diese den Pilz fördernd oder unterdrückend) andererseits ist, sollen tatsächliche Untersuchungen Aufschluß über die Angriffsmöglichkeiten des Parasiten geben.

3. Makroskopische Untersuchungen

Gräbt man den Wurzelstock einer rotfaulen Fichte vorsichtig aus, so kann man eine Reihe typischer Krankheitssymptome beobachten. Am heftigsten scheint die Infektion in den meisten Fällen am Wurzelstock selbst und an den davon ausgehenden Seitenwurzeln in einem Umkreis von etwa 50 cm zu sein. Auf ihrer Unterseite findet man bei starkem Befall die weißlich-gelben, sehr verschieden gestalteten Fruchtkörper des Parasiten. Sie treten besonders an solchen Stellen auf, wo der Boden locker ist, denn ihre Ausbildung scheint nur im freien Raume möglich. Dagegen tritt meist starker Harzfluß auf, und die Rinde ist bereits so sehr geschädigt, daß sie sich für eine Untersuchung der Eintrittspforten des Parasiten nicht mehr eignet.

¹⁾ Nach Annahme dieser Dissertation erschien der offizielle Kongreßbericht des Internationalen Verbandes Forstlicher Forschungsanstalten über die Tagung in Rom September 1953, bei der in der Sektion 24 „Forstschutz“ u. a. auch über Trametesschäden berichtet wurde (S. 649—655), sowie ein Bericht desselben Verbandes über eine Sonder-tagung über Wurzelfäule in Wageningen Juni 1954. Beide Veröffentlichungen bringen aber zu unserer Spezialfrage des Infektionsweges kein neues Material.

Betrachtet man dagegen den Wurzelstock einer Fichte, deren Holz noch wenig zersetzt ist und erst die Anfänge der Krankheit zeigt, so erkennt man eine große Zahl stark aufgetriebener Lenticellen. Diese Lenticellen-Wucherungen sind ein eindeutiges Anzeichen der Krankheit, denn im Bereich der Verpilzung wachsen die Korkwarzen, die am gesunden Stamm unscheinbar sind, warzenartig aus (HOPFFGARTEN 1933). Innerhalb dieser Lenticellen befindet sich ein weißes Myzel, das lebhaft an ihnen wuchert. Auf den Wurzeln, die diese Erscheinung zeigen, sieht man oft spärlich, zuweilen aber sehr zahlreich, weiße Myzelstränge von verschiedener Breite, die sich häufig verzweigen und die Wurzel wie ein Spinnennetz überziehen. Auffallend ist, daß diese Hyphenbänder oft auf



Abb. 13. *Trametes radiciperda*. Hyphenstränge und verpilzte Lenticelle auf der Wurzelrinde der Fichte (etwa 4fach)

eine Lenticelle zuzustreben scheinen, an der sie dann enden oder auch, sich verzweigend, in andere Richtungen fortwachsen (Abb. 13). Rhizomorphen, wie man sie bei *Rosellinia quercina* und vor allem beim Hallimasch findet, scheint *Trametes radiciperda* nicht zu bilden. Nur ein einziges Mal beobachtete ich einen Rhizoctonienstrang, der ebenso wie das Myzel weißlich war; darin eingeschlossen befanden sich eine Reihe dunkler Bodenpartikelchen. Kurz vor dem Eindringen des Stranges in eine Lenticelle lockerte sich der ursprünglich kompakte Myzelstrang in viele feine Myzelstränge auf. Ich habe einen Querschnitt desselben kurz vor seinem Eindringen in die Wurzel angefertigt. Da ich in der Literatur niemals das Auftreten von Rhizoctoniensträngen erwähnt fand, nehme ich an, daß es sich dabei um eine seltene Erscheinung

handelt. Die Borkenschuppen an den Befallstellen waren meist wie ausgebleicht und die äußersten blätterten leicht ab. Zwischen diesen Borkenschuppen traten überall kleine gelbweiße Pilzpolster zutage, die dem Myzel in den Lenticellen stark glichen. Die Größe und Form dieser Pilzpolster ist sehr unterschiedlich; denn mit dem Fortschreiten der Krankheit werden sie immer größer, fließen dann ineinander und bilden schließlich die eingangs erwähnten Fruchtkörper des Parasiten. Hebt man die Rindenschuppen vorsichtig ab, so bemerkt man, daß jene kleinen Polster nur die Endigungen zarter, weicher Pilzhäute sind, die ganz glatt, wie hauchdünnes Papier, oft auch nur einem Schimmelanfluge gleich, sich zwischen den Rindenschuppen entwickelt haben. Zwischen Holz und Bast dagegen zeigt *Trametes*, wenn überhaupt, so nur ein äußerst feines Myzelnetz, so daß sich die Rinde

nicht, wie dies für *Rosellinia quercina* und *Armillaria mellea* zutrifft, bei starkem Befall von dem Holzkörper leicht löst.

Verfolgt man die Wurzeln weiter in den Boden, so erkennt man äußerlich oft keinen Befall mehr, während im Holz bereits die typischen Symptome der Zersetzung beginnen. Die Krankheit pflanzt sich nämlich von dem Infektionsherd aus nur im Holz der Wurzel und des Stammes aufwärts fort, so daß man außerhalb der Infektionsstellen nur im Holz, nicht aber an der Rinde den Weg des Parasiten verfolgen kann. Rotfaule Fichten zeigen da, wo die Ausbreitung der Infektion im Stamminnern bzw. im Innern der Wurzel endet, oft eine vollkommen gesunde Rinde.

An dieser Stelle sei erwähnt, daß stets eine Probe gemacht wurde, ob es sich bei den Beobachtungen tatsächlich um einen Befall durch *Trametes radiciperda* handelte: Bringt man das zu untersuchende Material in eine feuchte Kammer, so entwickeln sich schon nach wenigen Tagen die für die Parasiten charakteristischen Konidienfruktifikationen (NEGER 1919)¹⁾.

Im allgemeinen ließen die oben beschriebenen Infektionsherde keine Symptome erkennen, die auf eine besondere Anfälligkeit seitens des Baumes hinweisen würden, wie sie z. B. durch abgestorbene Seitenwurzeln oder Wunden entstehen würden. Wenn jedoch ein Riß in der Rinde auftrat, so war dieser besonders stark von Krankheitssymptomen umgeben. Erwähnt sei noch, daß in vielen Fällen eine genaue Lokalisierung des Infektionspunktes möglich war, da sich Infektionen von irgendeinem Punkte einer Seitenwurzel ebenso gut wie vom Wurzelstock aus in zwei Richtungen ausbreiten können. Der Punkt der innerlich stärksten Zersetzung entspricht dann dem Infektionsherd. Dazu kamen als Erkennungszeichen in allen Fällen die oben beschriebenen äußeren Krankheitssymptome, die, wie schon erwähnt, wenigstens zu Beginn der Krankheit, nicht mit der Infektion fortschreiten.

4. Mikroskopische Untersuchungen

Betrachten wir die Schichtung der Fichtenrinde: Ein Übersichtsbild über das Periderm zeigt, daß es aus ganz verschiedenen Elementen aufgebaut ist: dem dunkler gefärbten Steinkork folgt eine Schicht Schwammkork, dann nacheinander Phlobaphenkork, Phellogen und bei gesunden Fichten ein gut entwickeltes Phelloderm. Die beiden letztgenannten Schichten sind durch die Zersetzungserscheinungen bei rotfaulen Fichten nicht mehr zu erkennen. Innerhalb einer Korkbandserie nimmt die Breite der Bänder von außen nach innen ab. Dies geschieht hauptsächlich auf Kosten des Schwammkorkes, der schließlich ganz fehlen kann, so daß das Jahresprodukt lediglich aus Stein-

¹⁾ Trotz dieser Versicherung glaubt Dr. H. BRAUN, der jetzt bei Prof. ZYCHA über *Trametes radiciperda* arbeitet, daß die nachstehend beschriebenen Symptome nicht ausschließlich auf *Trametes*-Infektion, sondern z. T. auf Misch-Infektionen (u. a. mit *Hallimasch*) zurückzuführen sind. Das gilt insbesondere für die Fähigkeit, das Periderm zu durchwachsen, die BRAUN mit Reinkulturen von *Trametes radiciperda* nicht erzielen konnte.

zell- und einigen Lagen Phlobaphenkork besteht (HOLDHEIDE 1951). Zwischen den Korksichten, und zwar jeweils da, wo eine neue Korkbandserie mit dem Steinkork beginnt, ist die Borke bei rotfaulen Fichten schon bei oberflächlicher Betrachtung stark zersetzt. Phellogen und Phelloderm scheinen im Vergleich mit dem übrigen Periderm relativ empfindlich zu sein und bieten dem Pilz die beste Angriffsmöglichkeit. Auf Tafel II, 1 sieht man, warum sich, wie eingangs erwähnt, die Borkenschuppen so leicht voneinander lösen: Zwischen ihnen befindet sich eine mehr oder weniger dichte Myzelhaut, die schon bei makroskopischer Betrachtung als feines weißes Häutchen an vielen Stellen zum Vorschein kommt. Bei stark rotfaulen Fichten befinden sich an der Infektionsstelle solche Hyphenbänder zwischen sämtlichen Borkenschuppen bis hinunter zu den Parenchymzellen des Bastes. Bei noch relativ jungen Infektionsherden sieht man sie nur im äußersten Teil der Borke wuchern. Tafel II, 1 zeigt links, wie der Parasit einen Verbindungskeil zwischen einer höher gelegenen und der darunter folgenden Borkenschuppe durch die Steinkorkzellschicht hindurch gebrochen hat. Der Pilz dringt auf diese Weise von Borkenschuppe zu Borkenschuppe vor.

a) Wund- und Lenticelleninfektion

In vielen Fällen geht die erste Infektion nachweislich von Rindenrissen, also Wunden, oder auch den Lenticellen aus, die nach RENNERFELT (1949) unter der Einwirkung des Pilzes zu wuchern beginnen. So zeigt Tafel II, 2 den Querschnitt durch eine stark aufgetriebene Lenticelle, die schon makroskopisch deutlich sichtbar mit weißem Myzel erfüllt war. Die von ihr ausgehenden Borkenschuppen sind durch die Zersetzung wie ausgebleichen und besonders der Schwammkork nimmt fast keine Farbe an. Die Hyphen jedoch sind intensiv blau gefärbt und in den Zellen auch einzeln deutlich zu erkennen. Tafel II, 3 stellt die Fortsetzung des vorigen Bildes dar, d. h. sie zeigt das Gewebe desselben Querschnittes weiter innen gelegen. Links oben sind die stark verpilzten Zellen der Korkwarze; der Pilz hat die Rinde bis zum Lenticellenkambium angegriffen; die Parenchymzellen des Bastkörpers zeigen noch keinen Befall. Dem Pilz voran jedoch geht die chemische Zersetzung des Wirtsgewebes. Die Antwort der Parenchymzellen ist eine starke Harzausscheidung, die sich in Form von vielen kleinen Tropfen in ihnen sammelt. Die dem verpilzten Gewebe am nächsten liegenden Zellen sind bereits abgestorben, während die darunter befindlichen noch einen dünnen, hellblau gefärbten Plasmamantel erkennen lassen, der im Begriff ist, weitere Terpentinstoffe abzusondern. Die nächste Abbildung (Tafel II, 4), wiederum als Fortsetzung der vorangehenden zu verstehen, zeigt, daß die Giftwirkung des Pilzes, immer schwächer werdend, sich bereits bis zum Kambium ausgewirkt hat. Die harzbildenden Zellen sind nur noch vereinzelt anzutreffen; die Zellen des Kambiums sind vollkommen gesund und teilungsfähig. Nur in die Markstrahlen (siehe zweiter Markstrahl rechts oben) ist der Parasit

bereits eingedrungen. Eine Menge Hyphen gelangen auf diesem Wege in das Innere des Bastes und von dort aus in den Holzkörper.

Das Fortschreiten der Infektion geht nun so vor sich, daß die in den Bastkörper eingedrungenen Hyphen, die stets isoliert bleiben, durch die Markstrahlen in das Innere der Wurzel gelangen. Dieses ist, wie wir wissen, bei der Fichte unverkernt und setzt dem Parasiten keinen Widerstand entgegen. Im Holzkörper verbreitet sich daher das Myzel nach allen Seiten hin in außerordentlich großer Geschwindigkeit. Das Holz weist dabei nacheinander die oben beschriebenen Zersetzungserscheinungen bis zur völligen Auflösung auf. Die Infektion schreitet nicht nur aufwärts und abwärts vor, sondern ebenso, nur viel langsamer, von innen nach außen, und erreicht schließlich das Kambium. Wird es zerstört, und dies geschieht meist erst in einem sehr späten Stadium der Krankheit, so stirbt der Baum ab. Im Bast geht die Verbreitung des Pilzes nur langsam vor sich. Die Parenchymzellen werden durchdrungen und die Infektion gelangt auch von außen her bis zum Kambium. Eine plötzliche Zerstörung desselben, wie es bei *Rosellinia* und *Armillaria* der Fall ist, fand ich jedoch bei *Trametes* niemals.

b) Infektion unmittelbar durchs Periderm¹⁾

Wir haben gesehen, daß *Trametes* sowohl in die Lenticellen als auch in Wunden einzudringen vermag. Hier entstehen dann später die weißlich-gelben Fruchtkörper, die aus den eben beschriebenen kleinen Myzelpolstern hervorgehen. Die Behauptung, daß die Fortpflanzungsorgane stets an den Eintrittspforten des Parasiten gebildet würden, trifft demnach auch für *Trametes radiciperda* zu. Auf eine eingehende Beschreibung der Fruchtkörper kann ich hier verzichten (HARTIG). Wichtig ist jedoch zu erwähnen, daß diese Pilzpolster bzw. Fruchtkörper keineswegs nur an den oben beschriebenen Stellen zum Vorschein kommen, sondern ebenso häufig irgendwo auf der Wurzelrinde, d. h. an solchen Stellen, die einwandfrei weder Wunden noch durchlässige Organe, wie sie die Korkwarzen darstellen, aufzeigen. Ich möchte daher die Borkenschuppen auch an solchen Stellen einer genauen Untersuchung unterziehen.

Was dem Betrachter eines Schnittes durch die Borke einer rotfaulen Fichte (die Schnittrichtung spielt dabei keine Rolle) als eigenartig sofort ins Auge springt, ist eine große Zahl zuweilen gleicher, zuweilen sehr unterschiedlich großer Löcher in den Wandungen der Peridermzellen. Bei schwach befallenen Wur-

¹⁾ Anmerkung des Referenten: Die nachstehenden Ausführungen haben den Referenten nicht restlos zu überzeugen vermocht, da er den beschriebenen Pilzperforationen ähnliche Tüpfelungen sehr verschiedener Größe auch aus gesundem Stammpерiderm kennt (vgl. u. a. Fig. 134 in YING-PE CHANG, *Anatomy of common North American pulpwood barks*. Tappi Monograph Series No. 14, New York 1954). Ref. bestreitet keineswegs die beobachteten Perforationen, vermutet aber, daß der Pilz dabei die natürlichen Dünnstellen der Tüpfel bevorzugt. Die Erscheinung verdient weitere kritische Beachtung.

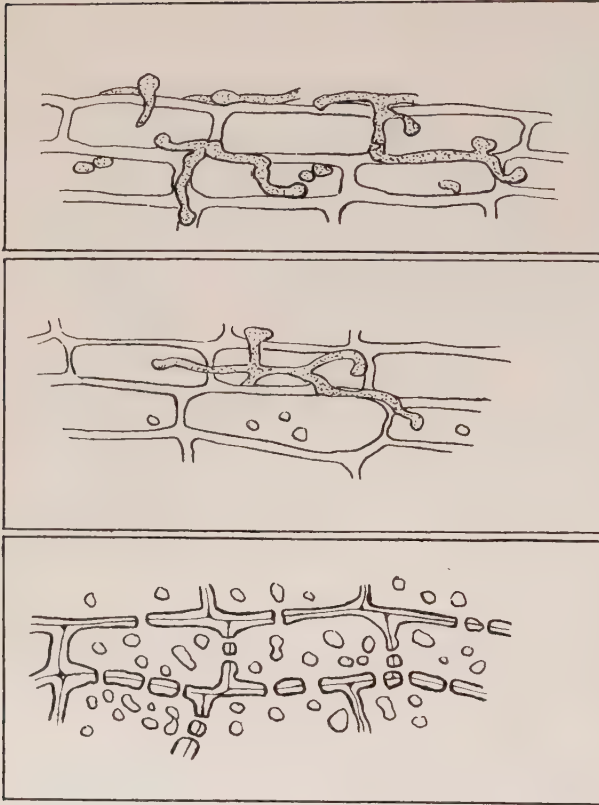
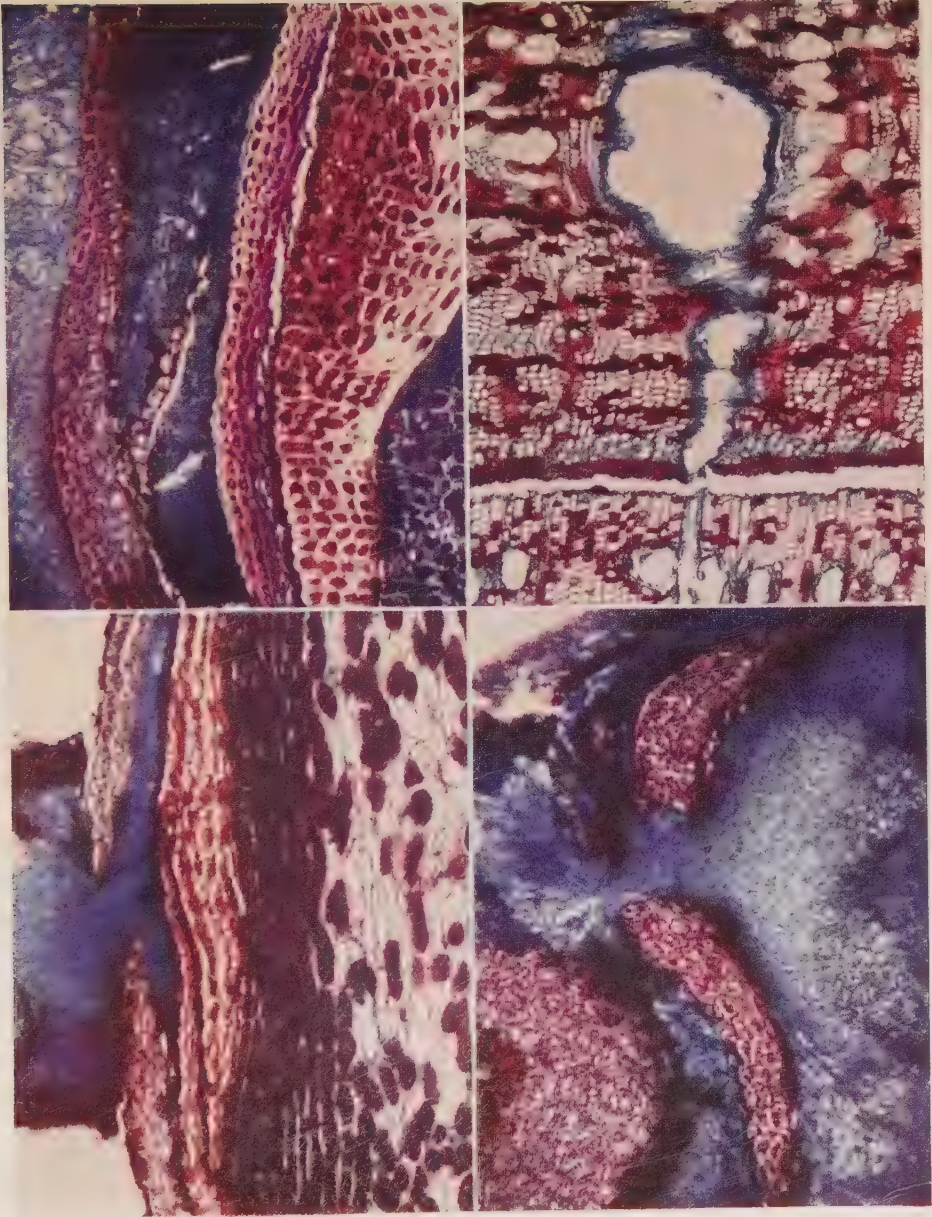


Abb. 14. *Trametes radiciperda*. a Infektionshyphen in die Peridermzellen eindringend. b Frühes Infektionsstadium der Wurzelrinde. c Perforationen im Rindengewebe einer infizierten Wurzel (etwa 1000fach)

zeln findet man diese Erscheinung nur vereinzelt (Abb. 14 b); bei starkem Befall waren alle Rindenschuppen bis zum lebenden Bastparenchym vollständig durchlöchert. Ich dachte dabei zunächst an Tüpfel und untersuchte die Borke gesunder Fichten zum Vergleich. Sie zeigte jedoch in keinem Fall ein ähnliches Bild. Hingegen fand ich bei der Untersuchung einer, wie ich annahm, gesunden Rinde sehr frühe Befallstadien. Abb. 14 a zeigt Pilzhypen auf der Wurzeloberfläche. Sie sind an einer Stelle angeschwollen und bohren sich von hier aus direkt in die Wandung einer stark verkorkten Zelle. Dieses Bild fand ich in verschiedenen

Abwandlungen sehr häufig, so auch das intrazelluläre Vordringen des Parasiten, wie ich es ebenfalls in Abb. 14 a dargestellt habe. In Abb. 15 ist ein Tangentialschnitt durch die Borke einer stark rotfaulen Fichte aufgenommen. Die Zellwände sind mit einer relativ gleich großen Perforation wie übersät; die Anordnung ist unregelmäßig. An den Randzellen erkennt man durch die Färbung der Mittellamelle mit Hilfe von Rutheniumrot, daß sie durchbrochen ist. Diese Tatsache möchte ich als einen Beweis dafür hinstellen, daß es sich hier nicht um Tüpfel handeln kann, bzw. daß die Erscheinung auch nicht durch eine Korkauflage zustande kommt, wie ich es bei STRASBURGER für ein anderes Objekt beschrieben fand.

Perforationen treten im Pflanzenreich auch häufig auf, ohne pathologisch bedingt zu sein. Gelegentlich erleidet die Kutikula eine Perforierung, die bis zur Ausbildung von deutlichen Lücken fortschreiten kann. Solche werden für die Kutikula gewisser Orchideen angegeben (LINSBAUER). Sie erreichen mitunter eine bedeutende Größe und erscheinen dann in radialer Richtung gestreckt. Lücken finden sich ferner an sezernierenden Organen,

Armillaria mellea

1. Rhizomorphe mit Infektionskeil, der sich zwischen die Borkenschuppen vorschiebt (quer)
2. Breite Hyphenbänder zwischen den Borkenschuppen (quer)

3. Durchstoß der *Rhizomorpha fragilis* durch die Borkenschuppen (quer)
4. Zerstörtes Bastgewebe mit stark erweitertem und verpilztem Harzgang (quer)

Alle vier Bilder ca. 120fach vergrößert

speziell an Drüsenhaaren, wenn die Kutikula für das produzierte Exkret nicht oder nicht hinreichend durchlässig ist¹⁾. Um derartige Zweckerscheinungen kann es sich, wie schon oben erwähnt, bei der Fichte jedoch nicht handeln. Auch in KÜSTERS pathologischer Pflanzenanatomie habe ich ohne Erfolg nach Parallelfällen gesucht, so daß ich der Vermutung nähergetreten bin, daß es sich hier tatsächlich um Durchbruchstellen des Pilzes handeln muß: Sollte der Parasit die Möglichkeit besitzen, jede Zellwand, auch die einer stark verkorkten Zelle ohne Schwierigkeit zu durchstoßen? Meine Vermutung wurde durch die Untersuchungen HARTIGS bestärkt, der zwar von keinen Beobachtungen über das Verhalten des Pilzes in der Borke berichtet, aber eine ähnliche Erscheinung im Holzkörper beschreibt: „Die dicken und dünnen Fäden durchbohren die Wandungen der Holzorgane mit der größten Leichtigkeit. So erkannte ich in den Holzfasern nicht nur die verschieden starken Myzelfäden, sondern auch die Löcher, welche von denselben in die Wandungen gebohrt waren ...“ Auch in den Parenchymzellen des Bastes beobachtete HARTIG bereits, daß die Zellwände durchlöchert sind. Die von ihm angefertigten schematischen Zeichnungen lassen erkennen, daß es sich dabei um die gleiche Erscheinung handelt, die ich in den Borkenschuppen rotfauler Fichten fand.

Was mich anfänglich noch zweifeln ließ, war die Tatsache, daß der Durchmesser der Durchbruchstellen zuweilen größer als der einer Pilzhyphe ist. Abb. 14 c zeigt, daß die Löcher eine sehr unterschiedliche Größe und Form besitzen können und daß sie unter Umständen zu größeren Rissen zusammenfallen. Ist das bei einem Pilzbefall denkbar? Ich selbst möchte diese Frage bejahen. Dem Pilz voraus geht, wie wir schon oben gesehen haben, eine starke Giftwirkung; die

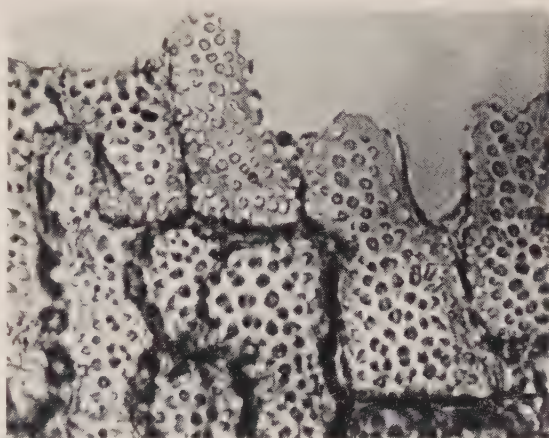


Abb. 15. *Trametes radiciperda*. Die pathologisch veränderten Zellen der Borke weisen eine starke Perforation auf (tang. etwa 500fach)

Zellen werden auf diese Weise so empfindlich, daß jede Zersetzungstärke denkbar ist. LIESE schreibt an Hand seiner elektronenmikroskopischen Untersuchungen an verblautem Kiefernholz zu dieser Frage:

„Auffallend ist der große Durchmesser dieser Löcher, der etwa demjenigen der Pori entspricht. Die lichtmikroskopischen Beobachtungen, nach denen die Bohrlöcher bedeutend kleiner als die Hyphen sein sollen, können an Hand dieser Bilder auch bei einer großzügigen Berechnung des Trockenschwundes nicht bestätigt werden. Vielmehr haben die Löcher mindestens den gleichen Durchmesser wie die durchwachsenden Hyphen.“

Ferner stimmte mich bedenklich, daß zwar in vielen der perforierten Gewebe bei geeigneter Färbung und Einstellung eine Unzahl von Hyphen

¹⁾ Neueste elektronenmikroskopische Untersuchungen über diese viel diskutierte Frage, siehe VOLZ 1952.

deutlich sichtbar wurde (Abb. 16), in anderen Fällen jedoch ließ sich, obwohl Bohrlöcher vorhanden waren, keine einzige Hyphe nachweisen. Die Tatsache, daß Pilzhypen wieder vollständig verschwinden können, fand ich aber auch in der Literatur häufig erwähnt. So schreibt HARTIG: „In einem späteren Befallsstadium bewiesen zahlreiche Löcher in den Wandungen bei verhältnismäßig spärlichem Myzel, daß viele Myzelfäden bereits wieder verschwunden sind.“ Ebenso stellte SCHMID (1954) bei *Armillaria* und FRANKE-GROSSMANN¹⁾ bei *Trametes* fest, daß die stark zersetzten Teile der Wurzeln in vielen Fällen kein Myzel enthalten.

Aus allen vorangehenden Untersuchungen resultiert, und ich glaube, dies mit Sicherheit sagen zu können, daß *Trametes* die Fähigkeit besitzt, jede Zellwand mit der größten Leichtigkeit teils fermentativ, teils mechanisch zu durchdringen.

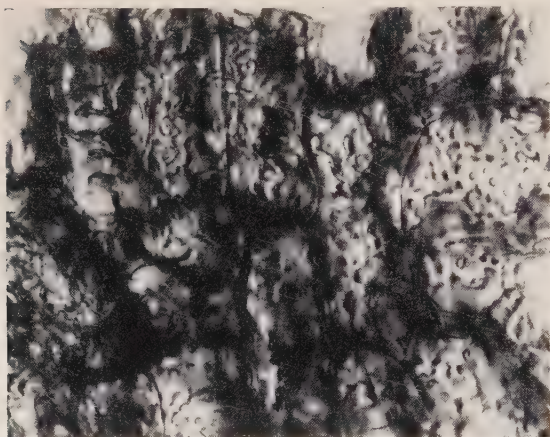


Abb. 16. *Trametes radiciperda*. Zahllose Pilzhypen durchwachsen die Zellen der Borke (tang. etwa 500fach)

Virulenz des Pilzes durch die Bodenbeschaffenheit begünstigt wird, sei es, daß durch schlechte Witterung oder Eingreifen in die Bestände durch Ausschlagen die Fichten besonders anfällig werden, vermag der Pilz die Wirtspflanze überall anzugreifen. Somit ist auch eine Kontaktinfektion zu bejahen, da der Pilz ohne Schwierigkeit von einer befallenen Rinde durch Berührung mit einer gesunden diese infizieren kann, allerdings wieder unter der Voraussetzung, daß die Befallsbedingungen günstig sind.

5. Zusammenfassung

Trametes radiciperda ist nicht auf Wunden oder anatomisch vorgebildete Organe in der Wurzelrinde, wie sie z. B. die Lenticellen darstellen, angewiesen. Zwar befällt sie der Parasit und die Infektion schreitet hier besonders schnell fort. Aber auch die vollständig verkorkten Zellen der Borke

Dies gilt auch für die stark verkorkten Schuppenborken alter Fichten. Wenn man die Fermentausrüstung dieses intensiven Holzzerstörers bedenkt, so ist eine solche Fähigkeit von *Trametes radiciperda* unbedingt glaubhaft. Es sind folglich für eine Infektion durch *Trametes* weder Wunden noch privilegierte Organe notwendig, wenn ein Befall derselben auch in keiner Weise bestritten werden soll. Bei geeigneten äußeren Bedingungen, sei es, daß die

¹⁾ Vortrag anlässlich des 11. Pathologen-Kongresses in Rom 1953.

vermag er mit Leichtigkeit zu durchbohren, nachdem er sie zuvor durch fermentative Einwirkung geschwächt hat. Das in der Literatur so häufig diskutierte Problem, welche Stellen der Wurzel der Pilz anzugreifen imstande ist, verschiebt sich somit auf die Frage allein, welche Vorbedingungen für ein Zustandekommen der Infektion notwendig sind. Sind sie erfüllt, d. h. ist der Zeitpunkt für einen Angriff des Pilzes günstig, so kann jede Stelle der Fichtenwurzel mit Leichtigkeit infiziert werden.

D. *ARMILLARIA MELLEA* AN FICHTE (Hallimasch)

Armillaria mellea, auch *Agaricus melleus* genannt, gehört zur Familie der Agaricaceen (GÄUMANN 1926). Der Pilz zählt als Saprophyt zu den verbreitetsten Erd- und Holzpilzen. Unter besonderen Umständen wird er an lebenden Bäumen fakultativ pathogen und verursacht, vor allem an Nadelhölzern aller Gattungen, ein plötzliches Absterben der Bäume. Der Hallimasch dringt unterirdisch durch Rhizomorphen von Wurzel zu Wurzel vor, bohrt sich in die Borke ein und infiziert von dort aus das Innere des Baumes. Zwischen Bast und Holzkörper verbreitet er sich als *Rhizomorpha subcorticalis* fächerförmig nach allen Seiten hin und steigt an älteren Bäumen zuweilen drei Meter und höher im Stamm empor. Die Pflanze reagiert auf das Eindringen des Parasiten mit einer außerordentlich starken Bildung von Harz und pathologischen Harzgängen. Durch diese Harzkanäle und durch die Markstrahlen verbreitet sich das Myzel in die leitenden Organe des Holzkörpers und veranlaßt durch Herauslösen des Lignins eine Weißfäule des Holzes. Durch die Zerstörung der Kambialzone sterben die befallenen Wurzeln schnell ab; bei starkem Befall vertrocknet der ganze Baum in kürzester Zeit. Im Herbst sieht man an den im Boden frei wachsenden Rhizomorphen sowie aus der Rinde der durch den Parasiten getöteten Wurzelstöcke die bekannten Fruchträger zur Entwicklung gelangen. Aus ihren Sporen geht ein fädiges Myzel hervor, aus welchem sich später die *Rhizomorphae subterraneae* entwickeln (HARTIG 1874 und 1878).

1. Bisherige Literatur

Die Frage nach der Infektionsweise von *Armillaria mellea* ist häufig diskutiert worden. Die ersten Beobachtungen haben wir auch hier wieder ROBERT HARTIG zu verdanken. Er untersuchte verschiedene Laub- und Nadelhölzer und stellte fest, daß der Hallimasch an Eichen fast ausschließlich saprophytisch auftritt, während seine Rhizomorphen bei Nadelhölzern die Fähigkeit besitzen, in gesunde, lebende Wurzeln einzudringen. Auf den Infektionsvorgang selbst geht HARTIG nicht näher ein. BREFELD stellte 1877 die ersten Kulturen des Pilzes her und infizierte unbeschädigte, frische Fichtenwurzeln in vitro. Die Infektion gelang schon nach wenigen Tagen, es fehlt jedoch auch hier jede Illustration oder Beschreibung des Vorganges. ZELLER (1926) gibt an, daß der Pilz bei Obstbaumwurzeln nur durch

Wunden oder an den Stellen einzudringen vermag, wo die Seitenwurzeln die Rinde durchbrochen haben, oder er benutzt zusammengewachsene Wurzeln als Brücke. Nach MÜNCH trifft dies für Nadelhölzer nicht zu. Er schreibt (1932, S. 398): „Wo die Rhizomorphen bei ihrem Fortwachsen im Boden auf eine für sie empfängliche Wurzel treffen, dringen sie durch die Korkhaut und Borke hindurch ein. Wundstellen sind zur Infektion nicht erforderlich, sie bieten für die Infektion durch die Rhizomorphen keinen Vorteil.“

DE BARY bestätigte 1884, daß die Myzelstränge Wurzelrinden gesunder Bäume, besonders die der Koniferen, zu durchdringen vermögen; es scheint mir jedoch möglich, daß er die Ansicht von HARTIG übernommen hat. Ich möchte hier nicht alle Namen derer aufzählen, die einen kleinen Beitrag zur Aufhellung der Lebensweise dieses interessanten Holzzerstörers geleistet haben. Erwähnt sei nur noch DAY (1927), der die Anfälligkeit der Nadelhölzer diskutiert, dann KUSANO (1911), der den Infektionsvorgang bei der japanischen Orchidee *Gastrodia elata* und bei Kartoffelknollen beobachtete, und NEGER (1908) mit einer kurzen Beschreibung der Infektion einer Weißtanne. Im ganzen läßt sich sagen, daß jede Art der Infektion: Wundinfektion, Lenticelleninfektion, Infektion durch die intakte Körperhaut und reiner Saprophytismus, stets leidenschaftlich verfochten wurde. Die Widersprüche sind meiner Ansicht nach nur dadurch zustande gekommen, daß verschiedene Objekte untersucht wurden, unter denen sich sowohl anfällige Arten wie auch resistente befanden, ohne daß diese Tatsache klar erkannt und die einzelnen Vertreter voneinander getrennt worden wären. Es war daher eine logische Folge der vorangegangenen Untersuchungen, daß THOMAS 1934 den Versuch machte, nicht nur den Angriff auf verschiedene Wurzeln mikroskopisch genau zu untersuchen, sondern vor allem Pflanzen im Hinblick auf ihre Resistenz zu prüfen. Darüber hinaus befaßte er sich an Hand zahlreicher Versuche in vitro mit der Frage, wodurch die unterschiedliche Anfälligkeit zustande kommt. Die Versuche, die THOMAS unternahm, erstrecken sich vor allem auf Dahlienzwiebeln, Kartoffelknollen, Möhren und verschiedene Obst- und Nußbaumarten. Obwohl er sich nicht mit dem Befall von Koniferenwurzeln beschäftigte, waren seine Untersuchungen für mich von größtem Interesse und in vielen Fällen eine Bestätigung meiner eigenen Beobachtungen. Ich werde jeweils an der betreffenden Stelle auf diese Arbeit Bezug nehmen. Seit 1934 ist meines Wissens keine Veröffentlichung über spezielle Fragen der Hallimaschinfektion erschienen.

Zum Abschluß dieses Kapitels zitiere ich noch kurz GÄUMANN, der 1951 alle bis zu diesem Zeitpunkt erschienenen Beiträge über *Armillaria mellea* als den Pilzparasiten, der die intakte Körperhaut zu infizieren imstande ist, mit folgenden Worten zusammenfaßt:

„Die im Erdboden wuchernden Stränge des Hallimasch können zwar unmittelbar durch Wunden in die Wurzel und den Wurzelhals unserer Laub- und Nadelhölzer eindringen; fehlen aber die Wunden, so kleben sich die Rhizomorphen mittels der schleimigen Substanz, von der sie unmittelbar hinter ihrer weißen, wachsenden Spitze umhüllt werden, an einer unversehrten Wurzel fest; überdies können einige Hyphen aus der Strangspitze in die Außenschichten der Wurzelrinde hinüberwachsen und dadurch den

Strang noch nachhaltiger in der Wurzel verankern. An der Berührungsstelle bildet der Strang einen Seitenast, der auf mechanischem Wege, ähnlich den Senkern der Mistel, einfach durch Eindrücken der Wirtszellen, die Epidermis und das Periderm durchbricht. Die Infektion unversehrter Baumwurzeln erfolgt also nicht durch einzelne Hyphen, sondern durch einen massiven Angriff der Stränge selbst.“

2. Spezielle Methodik

Zur Untersuchung gelangten durch *Armillaria mellea* befallene Fichtenwurzeln eines etwa 60jährigen Bestandes. Von Wurzeln verschiedener Stärke wurden solche Proben entnommen, auf deren Oberfläche sich Rhizomorphen des Parasiten befanden. Dabei mußte stets darauf geachtet werden, daß die Rinde noch nicht zu stark geschädigt war; verharzte oder bereits abgestorbene Teile sind zur Untersuchung ungeeignet. Unter den frischer befallenen Wurzelrinden bemühte ich mich, solche verschiedener Infektionsstärke aufzufinden.

Alle Materialstückchen wurden mit Bouin oder Formol fixiert und anschließend in Zelloidin eingebettet, um das außerordentlich leichte Ablösen der Rhizomorphen zu verhindern. Um die verschiedenen Stadien der Verbindung zwischen Parasit und Wirt besser verfolgen zu können, wurden Serienschnitte angefertigt. Auf diese Weise ließ sich auch mit Sicherheit feststellen, ob es sich an der Eintrittsstelle des Pilzes etwa um eine Lenticelle oder eine Wunde handelte. Außer der Färbung nach CARTWRIGHT, mit der ich gute Erfolge erzielen konnte, wandte ich die von THOMAS (1934) empfohlene Dreifachfärbung nach FLEMMING (Safranin-Gentianaviolett-Orange, Näheres siehe ROMEIS Nr. 961) an. Obgleich letztere nicht den gewünschten Kontrasteffekt zwischen Pilz- und Wirtsgewebe ergab, waren doch nach dieser Methode gefärbte Schnitte zum Vergleich sehr nützlich. Die stark geschädigten Korkzellen besaßen nur noch eine geringe Affinität zu Safranin, während die geschädigten Zellen des Bastkörpers und die Peridermzellen in frühen Zersetzungsstadien die Farbe besonders intensiv annahmen. Auf diese Weise ließ sich das toxische Vordringen des Pilzes gut demonstrieren. Andererseits war die Färbung des Pilzkörpers und des kranken Gewebes oft zu intensiv, um feinere Nuancen zum Ausdruck zu bringen, vor allem bei den Schnitten, deren Dicke 20 μ etwas überschreiten mußte, um den Infektionskeil des Parasiten nicht zu deformieren. Ungefärbte Präparate erwiesen sich in diesen Fällen durch die Gelb-Braun-Nuancierung des Bouin-fixierten Materials als besonders aufschlußreich.

3. Makroskopische Untersuchungen

Gräbt man den Wurzelstock einer Fichte aus, die am Stammanlauf die typischen Krankheitssymptome des Hallimasch zeigt, so sieht man, oft nur auf der Unterseite der Wurzeln, eine mehr oder weniger große Zahl schwarzbraune, den Faserwurzeln ähnliche Pilzstränge. Sie verzweigen sich häufig und scheinen die Wurzel förmlich zu umklammern. Diese Rhizomorphen sind die Ausgestaltung des vegetativen Myzels zu hochentwickelten Leitungsbahnen. Sie lassen sich, wenn man sie vorsichtig freilegt, über weite Strecken hin durch die oberen Bodenschichten verfolgen. Treffen die Rhizomorphen bei ihrem Fortwachsen im Boden auf eine für sie empfängliche Wurzel, so kleben sie sich mit einer Art Schleim, den die wachsende Rhizomorphenspitze absondert, auf der Wurzel fest. Auf eine Strecke von 2—3 mm unter dem Vegetationspunkt ist der junge Zweig immer ganz farblos und glasig. Mit wachsendem Abstand von der Spitze beginnt seine Rinde dann eine immer intensiver werdende schöne braune Färbung anzunehmen. Während der junge Hyphenstrang prall und glänzend ist, erscheinen die älteren Teile

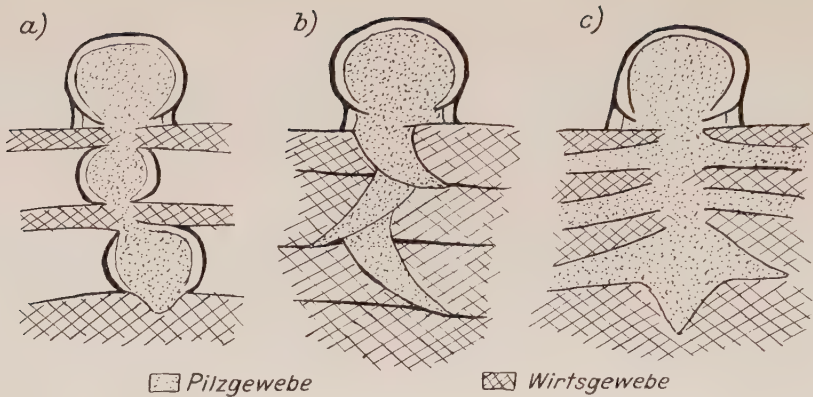


Abb. 17. *Armillaria mellea*. Verschiedene Formen der Infektion durch eine Rhizomorphe. Erklärung im Text. (Schematisch, etwa 25fach)

stumpf und fast schwarz gefärbt und kollabieren an der Luft sehr schnell zu 1—3 mm breiten Bändern. Die Rhizomorphen liegen der Rinde teils locker auf, teils sind sie mit der Wurzel fest verbunden. An vielen Stellen verschwinden sie unter einer Rindenschuppe, und man gewinnt oberflächlich den Eindruck, daß sich die Hyphenstrangspitze direkt in die Wurzel hineingebohrt hätte. Dies ist aber niemals der Fall. Die Rhizomorphen verlaufen stets tangential unter den Borkenschuppen und tauchen an irgendeiner Stelle wieder aus ihnen hervor oder enden, sofern ungünstige Verhältnisse eingetreten sind, unter ihr. Versucht man,

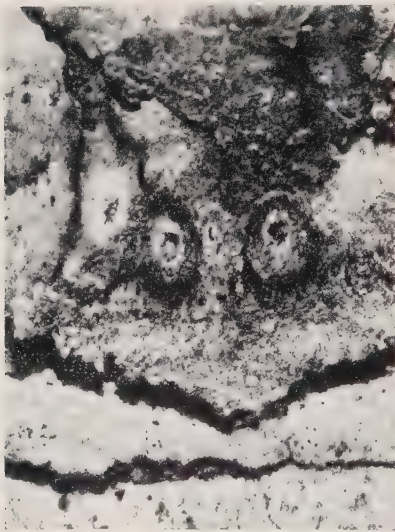


Abb. 18. *Armillaria mellea*. Wurzeloberfläche mit Infektionsstellen nach dem Entfernen der Rhizomorphe. (Aufsicht, etwa 15fach)

die Rhizomorphe von der Wurzeloberfläche abzuheben, so stellt man fest, daß sie in sehr verschiedenen Abständen senkrechte Verbindungen mit ihr eingegangen ist. Diese Verbindungsstränge, die HARTIG als *Rhizomorpha fragilis* bezeichnet, scheinen keilförmig in dem Wirtsgewebe verankert zu sein und haften zuweilen außerordentlich fest. Löst man sie heraus, so sieht man, daß diese Senker keineswegs braun gefärbt sind, wie die Rhizomorphe selbst, sondern reinweiß aus ihr hervorbrennen. Zuweilen verbreitert sich der Infektionskeil unter der durchgewachsenen Rindenschuppe zu einem kleinen weißen Lappen, er drängt die Rindenschuppe von der darunterliegenden ab, bräunt sich an der Luft und bildet eine Rhizomorphe 2. Ordnung, die dann in derselben oder auch in einer anderen Rich-

tung fortwächst. Dieser Vorgang kann sich zwei- oder dreimal wiederholen, so daß Knotenpunkte zahlreicher Rhizomorphen entstehen, so wie ich es auf Abb. 17 a schematisch dargestellt habe. Oft jedoch läßt sich ein Senker nicht weiter mit bloßem Auge verfolgen. Auf der Wurzeloberfläche entsteht dann ein Bild, wie es Abb. 18 wiedergibt. Die Hyphenkeile sind beim Abheben der Rhizomorphe herausgerissen worden, so daß kleine Löcher in der Wurzeloberfläche entstanden sind. Diese Löcher sind von einem schmalen Saum vollständig ausgebleichter Zellen umgeben; hierauf folgt eine stark gebräunte Zone, die die Schädigung des Wirtsgewebes noch in einer gewissen Entfernung vom Infektionskeil anzeigt. Die Infektionsstellen sind makroskopisch in der Rinde nicht besonders ausgezeichnet.

Nach diesen ersten Stadien läßt sich das Fortschreiten der Infektion äußerlich nicht mehr verfolgen. Erst bei stärkerem Befall erscheint in der Kambialzone die allbekannte derbe, schneeweiße *Rhizomorpha subcorticalis*. Sie breitet sich lappenförmig nach allen Seiten hin aus und führt durch die Zerstörung des Kambiums zum Absterben der Wurzel. Treten für den Pilz ungünstige Verhältnisse ein, oder ist die Rinde bereits so stark geschädigt, daß Luftsauerstoff in erhöhtem Maße eintreten kann, so verwandeln sich die weißen Myzellappen in Stränge, die sich bräunen und die Struktur einer *Rhizomorpha subterranea* annehmen (DE BARY 1868). Beim Verfaulen des Baumes treten sie hervor und verbreiten sich aufs neue im Boden, oder aber sie bilden die bekannten Fruchtkörper aus.

Daß die größeren Infektionsherde und bei fortgeschrittener Verpilzung alle befallenen Teile der Wurzel und des Stammes eine ungeheure Menge Terpentinstoffe bilden, die sich nach außen ergießen und durch Oxydation in Harz umwandeln, wurde bereits zu Beginn dieses Kapitels erwähnt. Diese Stellen eignen sich zur genaueren Untersuchung des Infektionsvorganges natürlich schlecht.

4. Mikroskopische Untersuchungen

a) Festheften der *Rhizomorpha subterranea*

Kommt die Spitze der Rhizomorphe in Berührung mit einer Fichtenwurzel, so klebt sie sich mittels einer Gallertmasse, die gleich hinter dem Vegetationspunkt abgesondert wird, auf ihr fest. Die Gallerthülle trocknet in Berührung mit der Wurzeloberfläche schnell ein und dient auf diese Weise dazu, die Rhizomorphe auf der Wurzel leicht zu befestigen. Durch das Eintrocknen entsteht ein Berührungszreiz, durch den die Rhizomorphe angeregt wird, wenige Millimeter unterhalb der wachsenden Spitze und noch bevor die eigentliche dichte Rinde sich stärker gebräunt und gefestigt hat, einzelne Hyphen aus dem Hyphenverband auszusenden. Diese Haarbüschel (Abb. 19 a) werden auf der Oberfläche, d. h. von der Rhizomorphenrinde und nicht vom Mark aus gebildet, so daß in diesem Stadium noch nicht die geringste Rindendurchbrechung unter den Haarbüscheln zu beobachten ist. Die Hyphen treten nun in Verbindung mit der äußersten Korkzellige und

fungieren sozusagen als Anker (Abb. 19 b), indem sie mit dem Wirtsgewebe relativ fest verwachsen. THOMAS gibt an, daß diese Verankerung bei Kartoffelknollen über weite Strecken hin erfolgt; bei Fichtenwurzeln ist es immer nur ein bestimmter Punkt, und zwar entstehen diese Ankerpunkte in ganz regelmäßigen Abständen, zuweilen dicht nacheinander (Abb. 18), dann wieder findet man mehrere Zentimeter keine einzige feste Verbindung zwischen Wirt und Parasit. Worauf dieses unterschiedliche Auskeimen der Rhizomorphe beruht, konnte ich leider nicht feststellen.

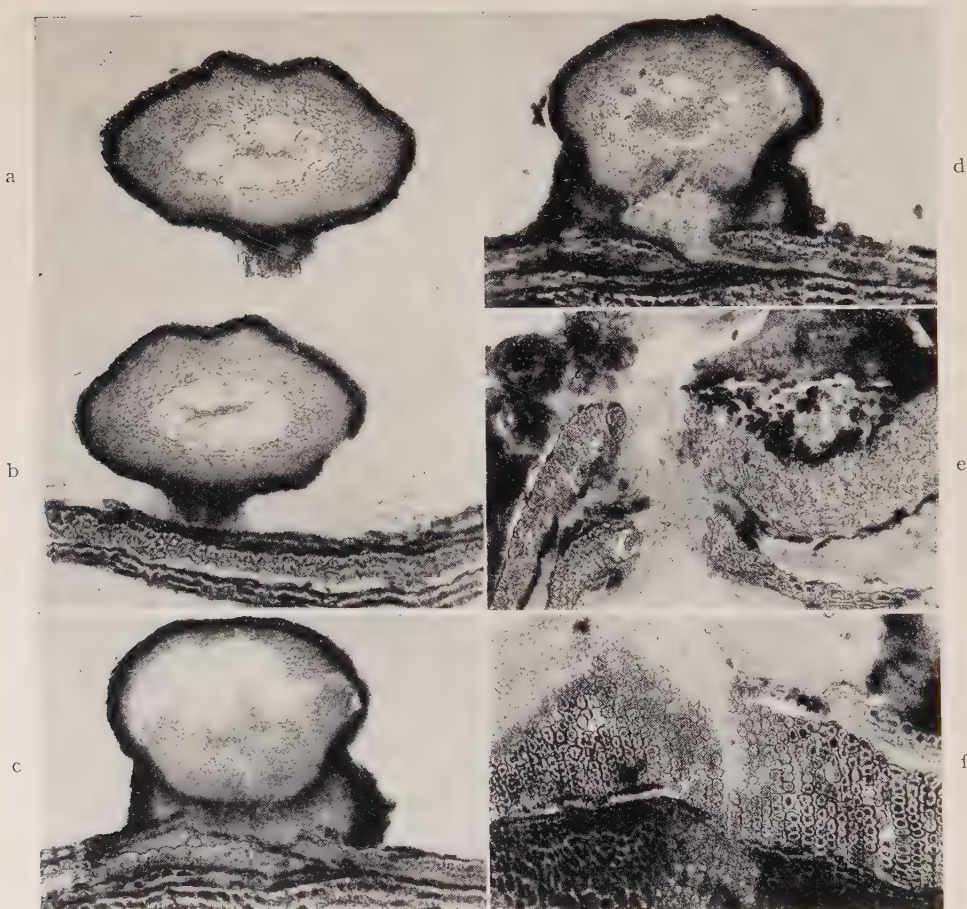
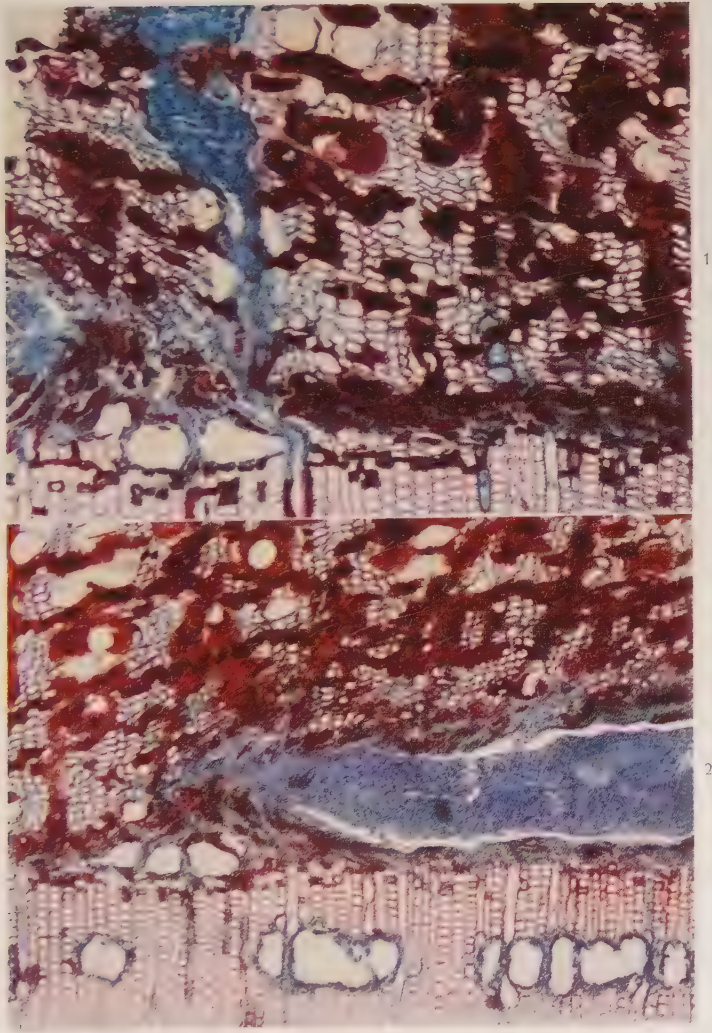


Abb. 19. *Armillaria mellea*. Infektionsfolge:

- a) Auskeimen einer jungen *Rhizomorpha subterranea*.
- b) Befestigung der Rhizomorphe auf einer Borkenschuppe.
- c) Erster Angriff auf das Wirtsgewebe. Zerstörung der obersten Peridermschicht.
- d) Infektionskeil, in das Periderm eindringend.
- e) Durchbruch der *Rhizomorpha fragilis* in Richtung auf den Bastkörper.
- f) Durchstoß durch eine Lenticelle und erste Infektion des Bastes. 100fach.

Armillaria mellea



1. Infektionsweg durch den Bastkörper (quer)
2. *Rhizomorpha subcorticalis* in der Kambiumregion
sich ausbreitend (quer)

Beide Bilder ca. 120 fach vergrößert

b) Entwicklung und Vorstoß der *Rhizomorpha fragilis*

Wir haben gesehen, daß die *Rhizomorpha subterranea* die Fähigkeit besitzt, sich an jedem beliebigen Punkt der Wurzeloberfläche zu verankern; nur ganz selten und wie zufällig wird dabei eine Lenticelle getroffen. In vielen Fällen konnte ich beobachten, daß die Rhizomorphe wenige Millimeter von einer Lenticelle oder einer Wunde entfernt vorüberwuchs, ohne sie zu berühren und zu infizieren. Der Befall derselben scheint für den Pilz keine besonderen Vorteile zu bieten. Ist die Rhizomorphe nun fest verankert, so wie wir es auf Abb. 19 c sehen, so beginnt der eigentliche Angriff auf das Wirtsgewebe. Voraussetzung dafür ist, daß die Korkhaut, die die Wurzel schützt, durchbrochen wird. Dies muß entweder durch mechanische Kraft des Infektionskeiles oder durch auflösende Eigenschaften der Hyphen geschehen. Nach THOMAS dringt die *Rhizomorpha fragilis* in Karotten als geschlossene Einheit vor, ohne einzelne Hyphen auszusenden. Der Vorstoß wird ausschließlich durch Eindringen der Zellen, also durch rein mechanische Kräfte der Rhizomorphenspitze erreicht. Erst nachdem sie einen tieferen Keil gebildet hat, setzt eine Destruktion der Zellen durch toxische Substanzen und durch Einzelhyphen, die sich oberhalb der eindringenden Spitze aus dem Verband lösen, ein¹⁾. Bei der fleischigen Karotte ist dieses Vorgehen ohne Schwierigkeit denkbar, bei Fichtenwurzeln hingegen muß die Infektion anders vonstatten gehen. Das Eindringen der stark verkorkten Peridermzellen einer alten Borke allein auf mechanischem Weg ist nicht möglich. Das Wirtsgewebe muß daher erst auf den Angriff vorbereitet werden. Dies geschieht zunächst durch chemische Stoffe, die die Hyphenspitze absondert. Der Inhalt der Korkzellen wird stark verändert und färbt sich intensiv rotbraun, kurze Zeit später ebenso die Zellwände (Tafel III, 2). Im nächsten Stadium setzt der Angriff der Einzelhyphen ein. Sie dringen nur wenige Zellschichten der Rhizomorphenspitze voraus und durchwachsen und schädigen die Korkzellen in hohem Maße. Die Zellwände erscheinen wie ausgebleicht und nehmen fast keine Farbe mehr an. Der Zellinhalt ist oft völlig verschwunden, und die ganze Zelle ist mit einem Hyphengewirr erfüllt. Die verschiedenen Zersetzungsstadien lassen sich auf Farbtafel III gut verfolgen.

Das Wirtsgewebe ist nun so stark geschädigt, daß der eigentliche Vorstoß der *Rhizomorpha fragilis* beginnen kann, indem die Masse der Hyphen sich gegen die äußere Korkschicht preßt und die Zellen auseinanderdrängt. Dabei müssen sowohl mechanische wie auch toxische Kräfte zur Auswirkung kommen, denn die Zellen werden nicht nur gespalten, sondern die Zellwände in ebenso starkem Maße aufgelöst. Wäre der mechanische Druck allein verantwortlich, so müßten die zur Seite und zusammengedrückten Zellen irgendwo erhalten bleiben, oder die Korkhaut müßte der Länge nach aufreißen. Dies ist aber nicht der Fall, sondern die Zellen, mit denen die Rhizomorphen-

1) GÄUMANN verallgemeinert diese Beobachtung von THOMAS, meinen Untersuchungen nach fälschlich, auch für Gehölzwurzeln.

spitze in Berührung kommt und gegen die sie einen Druck ausübt, verschwinden vollständig. In den breit vordringenden Hyphensträngen sieht man fast immer die Überreste der zerstörten Zellen, doch auch sie verschwinden allmählich (Tafel III, 2/3).

Die *Rhizomorpha fragilis* kann sich auf verschiedene Weise entwickeln, d. h. sie nimmt unterschiedliche Formen an, von denen ich einige in Abb. 17 schematisch dargestellt habe. Die erste Möglichkeit (Abb. 17 a) habe ich bereits schon erwähnt: die Rhizomorpha schwillt, nachdem sie eine Borkenschuppe passiert hat, unter derselben zu einer neuen *Rhizomorpha subterranea* an. Dadurch wird die oberste Rindenschicht von der darunterliegenden abgehoben, und es entsteht ein freier Zwischenraum, in dem die neue Rhizomorpha in beliebiger Richtung fortwächst. Diese Rhizomorpha bildet dann wiederum nach unten einen Infektionskeil und so fort, bis die Borke durchstoßen ist. Bei einer anderen häufigen Form der *Rhizomorpha fragilis* (Abb. 17 b) wird stets von einem Infektionszapfen aus in der entgegengesetzten Richtung ein Zapfen 2. Grades gebildet. Die Rhizomorphe scheint auf diesem Wege den geringsten Widerstand vorzufinden, und darüber hinaus ist vielleicht ihre Durchschlagskraft an der breitesten Stelle am stärksten (Abb. 19 d). Eine weitere Form ist in Abb. 17 c dargestellt. Hier breitet sich die Rhizomorphe fächerförmig aus, sobald sie eine Borkenschuppe passiert hat, bricht dann durch die nächste Schuppe, unter der sie sich ebenfalls verbreitert und so fort (vgl. Tafel III, 1). Es entstehen auf diese Weise Bilder, wie sie denen von *Trametes radiciperda* ähnlich sind. Auf die letztgenannte Art werden große Strecken der Borken tangential verpilzt, während bei den anderen Formen nur die Infektionsstelle selbst und ein kleiner Umkreis davon zerstört wird. Ich muß hier noch erwähnen, daß diese drei Infektionsarten untereinander variiert vorkommen, so daß ich den Eindruck gewonnen habe, daß der Parasit stets den Weg ins Innere der Wurzel benutzt, der für ihn am günstigsten ist, d. h. der den geringsten Widerstand bietet. Dieses Bestreben kommt auch in Abb. 19 f zum Ausdruck: eine vom Korkkambium gebildete junge Lenticelle wird von der vordringenden Rhizomorphe scheinbar mit großer Leichtigkeit durchwachsen, indem die Zellreihen auseinandergedrängt, teils aufgelöst werden. Bis zum Bast dringt die Rhizomorphe dabei stets als geschlossene Einheit vor.

c) Destruktion und Durchdringung des Bastes

Hand in Hand mit dem Vordringen der *Rhizomorpha fragilis* geht, wie wir schon gesehen haben, die Zerstörung der angrenzenden Gewebepartien. Aber nicht nur die Peridermzellen werden gebräunt und zersetzt, sondern auch das Bastgewebe beginnt schon in großer Entfernung von der Rhizomorphenspitze sich zu verändern. Die Zellen unterhalb des Korkes nehmen sehr bald eine so intensive Farbe an, daß sie eine dichte, dunkelrot-braune Masse bilden und sich oft einzeln kaum mehr unterscheiden lassen (Tafel III, 1). Während die Korkzellen in einem geringeren Abstand vom Hyphenstrang noch weniger stark verändert sind, zeigen die dünnwandigen Zellen

des Bastkörpers bereits eine weitgehende Schädigung, sterben schließlich ab und füllen sich mit Wundgummi. Dies zeigt deutlich die weit größere Resistenz der Borke an. THOMAS schreibt, daß die toxischen Substanzen auf die Korkzellen überhaupt keinen Einfluß auszuüben vermöchten; dies kann ich für Nadelhölzer, wie wir bereits gesehen haben, nicht bestätigen.

Die Frage, welcher Art die stark färbbare Substanz in den geschädigten Zellen ist, wurde häufig diskutiert. MÜNCH nimmt an, daß es sich um ein Oxydationsprodukt des Zellinhaltes handelt und erst nach dem Tode der Zellen entsteht. WHITE dagegen hält das Wundgummi für ein Produkt des lebenden Gewebes. THOMAS stellt fest, und ich teile darin seine Ansicht, daß die Entstehung des dunklen Zellinhaltes mit der Bräunung der Zellwände fast gleichzeitig vor sich geht. Er schreibt:

"If the browning of the wall is indicative of the death of the cell and a normal staining wall indicative of a healthy cell, then it is necessary to assume that the formation of the wound gum occurs with the death of the cell or shortly after. This would not support the view that it is a secretion of the living cell. If, on the other hand, the wall shows signs of browning before the protoplasm is dead, it may possibly mean that the wound gum is a secretion of the living cell. The former view seems rather more probable."¹⁾

Nach dem Passieren des Periderms dringt die Rhizomorphe nicht weiter als geschlossener Strang vor. Sie bedarf von nun an keiner größeren mechanischen Kräfte mehr, da sie ja bereits totes Gewebe durchdringt. Es findet eine Auflösung in viele Einzelhyphen statt, die nun ihrerseits den Bast infizieren. Zarte Hyphen durchbohren die Wände der Parenchymzellen und lösen sie auf. Der Pilz benutzt auch hier wieder den Weg des geringsten Widerstandes ins Innere der Wurzel. THOMAS beobachtete, daß die Hyphen bei einer Pastinake ausschließlich den Interzellularen folgen, anstatt von einer Zelle in die nächste zu gelangen. Dies ist naturgemäß bei der Fichtenwurzel nicht möglich, soweit nicht die Markstrahlen und Harzkanäle die Leitung übernehmen. Dies geschieht in der Tat in hohem Maße. Die Randzellen der Harzkanäle sind dünnwandig und werden schnell aufgelöst. Die Gänge werden dadurch stark erweitert, und ihre Größe nimmt nicht selten um das Fünffache zu (Tafel III, 4). In sie ergießt sich der Harzsaft, den das geschädigte Gewebe absondert. Die Hyphen verbreiten sich in den Harzgängen sehr schnell aufwärts und abwärts, viel weiter als die *Rhizomorpha subcorticalis* sich im Bast entwickeln kann. Sie werden durch den Harzfluß anscheinend nicht behindert. Auf Schnittpräparaten sieht man nicht selten dicke Hyphenstränge die Harzkanäle in allen Richtungen durchziehen. So füllt auf Tafel IV, 1 das Myzel einen Harzgang vollständig aus, und der Pilz gelangt auf diese Weise bis in die Kambialzone. Gleichzeitig stoßen einzelne Hyphen von den Harzgängen in den Bastkörper vor und zerstören ihn, soweit er nicht schon durch chemische Einwirkung zersetzt ist. Bei frühen Angriffsstadien sind die Parenchymzellen oft vollständig durchlöchert; spä-

¹⁾ Bei dem Befall durch *Trametes radiciperda* sondert meiner Ansicht nach der lebende Plasmamantel (vgl. Tafel II 3) die stark färbbare Substanz ab. Ob deshalb Unterschiede im Wundgummi von *Trametes* und *Armillaria* bestehen, bleibt einer späteren Untersuchung vorbehalten.

ter ist die Bildung von Terpentinstoffen so stark, daß keine Einzelheiten mehr zu erkennen sind. Bei der Zersetzung der Zellen hält die Mittellamelle dem Angriff am längsten stand; die Sekundärlamellen lösen sich unter der Einwirkung der Toxine schnell von ihr ab und verschwinden bald vollständig. Im Endstadium der Krankheit sieht man zwischen den Parenchymzellen schließlich nur noch Lücken mit spärlichen Wandresten von Siebzellen und vereinzelt dünnen und dicken Hyphen.

d) *Rhizomorpha subcorticalis* und Infektion des Holzkörpers

Haben die Hyphen die Kambialzone erreicht, so schließen sie sich wiederum zu einer Rhizomorphe, der sog. *Rhizomorpha subcorticalis*, zusammen (Tafel IV, 2). In der nährstoffreichsten Zone der Pflanze nützt der Parasit ohne Rücksicht den Saftstrom aus (SCHMID 1954), zerstört die Siebzellen und wächst mit großer Schnelligkeit fächerförmig in alle Richtungen. An Stelle des Kambiums findet man in diesem Stadium meist nur noch eine Schicht verharzter Zellen. Die schädigende Wirkung eilt also auch hier wieder der Rhizomorphenspitze voraus und vergiftet das Kambium durch „Fernwirkung“. Die vorstoßende Rhizomorphe drängt Bast und Holz auseinander und besiedelt und zerstört nun auch den Holzkörper. Das Myzel dringt in die Markstrahlen ein und verbreitet sich von ihnen aus seitlich in die angrenzenden Tracheiden. Es gelangt in die Harzgänge des jüngsten Jahres, die oft so stark vermehrt und vergrößert sind, daß sie ineinander fließen und lange Risse bilden (Tafel IV, 2).

Ist der Pilz im Innern des Holzkörpers, so wird das Holz durch Herauslösen des Lignins bald durchgehend weißfaul. Auf die Zersetzungserscheinungen will ich hier nicht näher eingehen, sondern verweise auf HARTIG (1900). Erwähnt sei noch, daß die *Rhizomorpha subcorticalis* sich, sobald die Rinde so stark zersetzt ist, daß reichlich Luftsauerstoff eintreten kann, oder wenn ungünstige Verhältnisse für den Pilz auftreten, in Stränge aufteilt, die sich mit einer Rinde umgeben, bräunen und die Struktur einer *Rhizomorpha subterranea* annehmen. Ein Übergangsstadium ist auf Abb. 20 zu sehen: rechts beginnen sich die Außenhyphen zu bräunen; links ist bereits die zellige, dunkelumrandete Rinde deutlich von dem mit wirren Hyphen erfüllten Markkörper zu unterscheiden.

e) Abwehrreaktionen

Bei dem eben beschriebenen Krankheitsverlauf stirbt die Wurzel stets ab, und oft wird beim Fortschreiten der Infektion der ganze Baum getötet. Der Befall durch *Armillaria mellea* wirkt jedoch keineswegs immer tödlich. Es kommen auch Fälle vor, in denen der Parasit in die Wurzel eindringt, dann aber, nach geringer Ausbreitung in der Rinde, wieder zum Stillstand gebracht wird (MÜNCH 1932). Der Angriff kann also abgeschlagen werden und die Wundstelle vernarbt mit der Zeit oder wird überwältigt. Oft ist an jungen, im empfänglichsten Alter stehenden Koniferen zu sehen, daß der Pilz

mehrere Jahre nacheinander abwechselnd vorgedrungen und wieder zum Stillstand gekommen ist, so daß an den Wurzeln krebsartige Geschwülste entstehen. Ohne Zweifel entspricht dieses abwechselnde Vordringen und Zurückbleiben des Pilzes abwechselnden Zuständen der Empfänglichkeit und

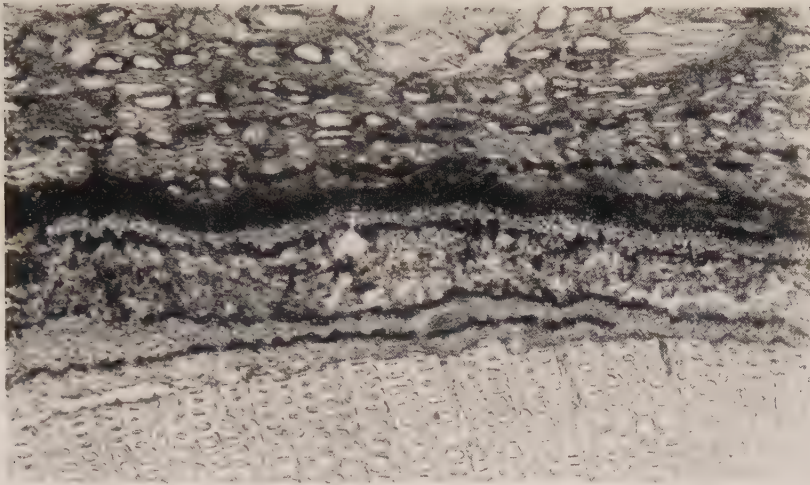


Abb. 20. *Armillaria mellea*. Umwandlung einer *Rhizomorpha subcorticalis* in eine *Rhizomorpha subterranea* (längs, etwa 100fach)

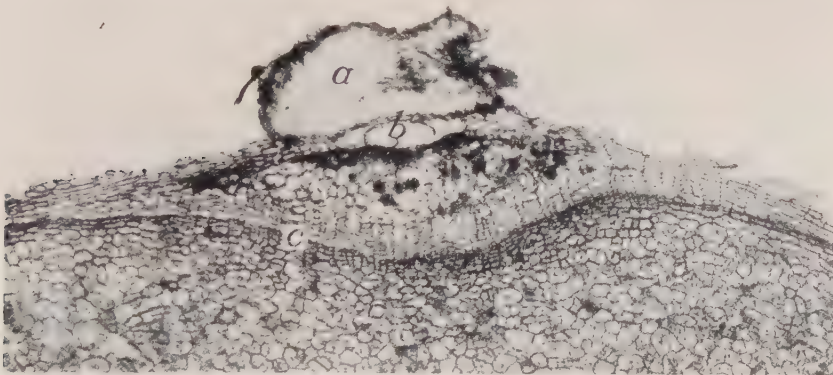


Abb. 21. *Armillaria mellea*. Wundkorkbildung an der Wurzel einer *Juglans hindsii*.
a) Alte Rhizomorphe. b) *Rhizomorpha fragilis*, die alte Korkhaut durchdringend.
c) Neue Korkhaut (quer, 40fach. Nach THOMAS)

Immunität der Wirtspflanze. Es bleiben dann, wenn der Angriff dauernd abgeschlagen und der Schaden vernarbt ist, verkiente Stellen am befallenen Wurzelholz zurück, wie man sie bei älteren Nadelholzstöcken und -wurzeln häufig finden kann. Eine Wundkorkbildung zur Abwehr des Parasiten, wie sie THOMAS an der resistenten Walnußwurzel beobachtete (Abb. 21), konnte

ich an der Fichte nicht feststellen. Die Zellen des Bastes scheinen hier nicht in der Lage zu sein, in Form von Abwehrmaßnahmen dem Vordringen des Pilzes Einhalt zu gebieten. Dies entspräche der Ansicht von THOMAS, daß nur resistente Hölzer die Möglichkeit besitzen, sich durch Korkbildung gegen das Eindringen des Parasiten abzuriegeln, oder aber das kranke Gewebe (diese Möglichkeit läßt THOMAS offen) abzuschneiden, sobald das Vordringen des Pilzes durch andere Umstände bereits zum Stillstand gebracht ist.

5. Zusammenfassung

Armillaria mellea bedarf beim Befall von Fichtenwurzeln keiner Wunden oder anatomisch vorgebildeter Infektionswege. Der Parasit vermag an jeder beliebigen Stelle der Wurzel die Rinde zu durchbrechen. Dies geschieht mit Hilfe der mechanischen und toxischen Kräfte der *Rhizomorpha fragilis*, die bis zum Gewebe des Bastes als geschlossene Einheit vordringt. Dann löst sie sich in Einzelhyphen auf, die besonders durch die Markstrahlen und Harzkanäle zur Kambialregion gelangen. Auch hier geht die chemische Zerstörung den Hyphen voraus.

Wenn man die ungeheuer große Verbreitung des Hallimasch im Boden zusammen mit seinen Infektionsmöglichkeiten betrachtet, so müßte das Zusammentreffen dieser beiden Faktoren allein mit der Zeit ein Absterben sämtlicher Fichtenbestände zur Folge haben. Da dies augenscheinlich nicht zutrifft, muß ein dritter Faktor zu den beiden erstgenannten hinzukommen, damit eine Infektion gewährleistet wird. Im großen gesehen, ist also auch der Befall durch *Armillaria mellea* eine Frage der Widerstandsfähigkeit der Wirtspflanze.

Diskussion

Die durch die verschiedenen Wurzelpilze verursachten Krankheiten zeigen schon bei oberflächlicher Betrachtung ein sehr unterschiedliches Bild. Stellt man genaue mikroskopische Untersuchungen an, so ergeben sich weitere Unterschiede, die bis in die feinsten Differenzierungen zu verfolgen sind. Nur das Endstadium der Erkrankungen ist einheitlich: die befallenen Gewebe sterben ab und die ganze Pflanze wird getötet.

Der unterschiedliche Befall der Gewebe der Wirtspflanze ist einerseits durch die anatomische Spezialisierung des Parasiten, andererseits durch die physiologische Abwehrbereitschaft der Wirtspflanze bedingt. Ein organspezifischer Befall kann bereits, wie wir gesehen haben, beim ersten Angriff des Pilzes auf die Wurzel eintreten: die Mykorrhizapilze der Orchideen sind bei der Infektion streng an die Wurzelhaare gebunden; *Rosellinia quercina* befällt vorzugsweise die Lenticellen. Eine wesentlich geringere Spezialisierung auf anatomisch vorgebildete Organe in der Wurzelrinde weist *Trametes radiciperda* auf. Der Parasit faßt zwar in den Lenticellen mit besonderer Leichtigkeit Fuß, doch auch die intakte Körperhaut stellt kein wesentliches Hindernis für den Befall dar. Für

Armillaria mellea schließlich bietet die Infektion durchlässiger Organe keine besonderen Vorteile mehr; der Parasit durchbricht stets das gesunde, unbeschädigte Periderm der Wurzel.

Hier erhebt sich die Frage nach der Bedeutung der Borke und ihrer Eigenschaft als Schutzorgan. Wie der menschliche Körper durch die Haut, so ist auch die Pflanze durch ihre peripheren Abdichtungsschichten gegen das Eindringen einer großen Zahl von Mikroorganismen passiv geschützt. Die Bedeutung dieser Eindringungsresistenz ergibt sich negativ aus allen jenen Fällen, wo ihr Schutz nicht besteht, also etwa bei Wunden und durchlässigen Organen, wie sie Wurzelhaare und Lenticellen darstellen. Die Mykorrhizapilze der Orchideen und *Rosellinia quercina* sind nicht in der Lage, die Kutikula bzw. die Korkhaut zu durchdringen und können nur durchlässige Stellen in der Borke als Infektionsweg ins Innere der Wurzel ausnützen. Die Dicke der Korkschicht spielt hier also keine Rolle.

Bei den Parasiten, die die intakte Körperhaut infizieren, liegen die Verhältnisse anders. Zwischen der Dicke der Korkhaut und der Befallshäufigkeit besteht hier zweifellos eine gewisse Korrelation. So stellte APPEL bei *Phytophthora* und einigen *Fusarium*-Arten fest, daß der Pilz keine dicken, wohl aber dünne Korkschichten zu durchbrechen vermag. TISDALE schreibt, daß *Fusarium lini*, der Erreger der Flachswelke, die Epidermis junger Wurzeln zu passieren imstande ist; wird aber um die Infektionsstelle im Innern der Wurzel ein sekundäres Periderm gebildet, so vermag der Parasit nicht, es zu durchbrechen. TISDALE hält jedoch für möglich, daß die Reaktion des Wirtsplasmas den Pilz an dem betreffenden Zeitpunkt bereits so stark geschwächt hat, daß aus diesem Grunde keine weitere Ausbreitung mehr möglich ist. FAWCETT beobachtete bei *Phytiacystis citrophthora*, daß der Parasit die Fähigkeit besitzt, durch die unbeschädigte Korkhaut von *Citrus*-Wurzeln vorzudringen, vorausgesetzt, daß hinreichende Feuchtigkeit zusammen mit einer günstigen Bodentemperatur über eine längere Zeitspanne hin auftreten. Die Genauigkeit der Untersuchungen über diese Fragen scheint mir in den meisten Fällen unzulänglich. Man findet jedoch in der Literatur immer wieder die Ansicht vertreten, daß im allgemeinen eine Infektion durch die gesunde, intakte Körperhaut nicht stattfindet, sondern erst Wunden oder durchlässige Organe den Weg ins Innere der Wurzel öffnen. Nur gelegentlich findet eine Infektion durch dünne Peridermschichten statt, und dies geschieht allein durch die mechanischen Kräfte des Parasiten. Die Durchdringung dicker Peridermschichten ist stets abgelehnt worden. Eine Ausnahme bildet hier nur *Armillaria mellea* und, wie die vorliegenden Untersuchungen zeigen, *Trametes radiciperda*. Diese beiden Parasiten sind imstande, dicke Korkschichten verhältnismäßig alter Wurzeln zu passieren. Die Frage, ob die Dicke des Periderms nicht auch hier einen gewissen Einfluß auf die Infektionshäufigkeit besitzt, kann ich nicht mit Sicherheit beantworten. Bei alten Borken findet man zuweilen Infektionsstellen, die in das Periderm eingelagert sind und nicht bis zum lebenden Bastkörper reichen. Die Infektion ist zum Stillstand gekommen, bevor der Pilz eine Erkrankung der Wirts-

pflanze herbeiführen konnte. Ich halte es für wahrscheinlich, daß die Zeitspanne günstiger Infektionsbedingungen hier nicht lange genug angedauert hat, um ein Passieren der dicken Borke zu gewährleisten. In diesem Fall stände also auch bei *Armillaria* und *Trametes* die Infektionshäufigkeit in umgekehrtem Verhältnis zur Dicke der Korkhaut, wenn diese auch, anatomisch gesehen, kein eigentliches Hindernis für die Parasiten darstellt.

Wie erklärt man sich nun die Fähigkeit der Erreger, dicke Borken zu durchdringen? GÄUMANN (1951) schreibt, daß Infektionshyphen zuweilen mit einem Druck bis zu 7 Atmosphären verdickte Zellwände perforieren können. Zur Veranschaulichung dieser Leistung sei daran erinnert, daß der mittlere Gasdruck im Zylinder eines modernen Hochleistungs-Flugzeugmotors etwa 7 Atmosphären beträgt. Dennoch ist ein rein mechanisches, gewaltsames Durchbrechen dicker Peridermschichten wohl kaum denkbar. *Trametes* und *Armillaria* müssen daher im Unterschied zu den anderen Wurzelpilzen befähigt sein, ein Enzym zu produzieren, das kutin- und suberinartige Substanzen abbaut und damit erst den mechanischen Eindringungsprozeß ermöglicht. Es ist erstaunlich, daß meines Wissens niemals der Versuch gemacht wurde, dieses Enzym nachzuweisen. Im Gegenteil findet man überall die Ansicht vertreten, daß die Mikroorganismen in keiner Weise eine zersetzende Wirkung auf die verkorkten Zellen auszuüben vermögen (WAKSMAN und THOMAS).

Der erste Angriff auf den Wirt ist, wie wir gesehen haben, durch den organspezifischen Befall sehr unterschiedlicher Art. Auf welchem Infektionsweg breitet sich nun der Pilz im lebenden Rindengewebe und im Holzkörper aus? Während primitive Parasiten keiner bestimmten Ausbreitungsbahn folgen, sondern das Gewebe ohne Rücksicht auf seine histologische Differenzierung ungeordnet durchwuchern, tritt mit der Verfeinerung der parasitischen Fähigkeiten des Erregers eine Auswahl der Wirtszellen und des Wirtsgewebes ein. Die stärkste Spezialisierung weisen die Mykorrhizapilze der Orchideen auf. Sie wachsen ausschließlich in der primären Wurzelrinde, dringen also nie durch die Endodermis in den Zentralzylinder ein. Ich möchte hier nicht näher auf die Ausbreitung dieser Pilze eingehen, sondern verweise auf die Untersuchungen von BURGEFF. Die Wege der besprochenen Wurzelparasiten ins Innere der Wirtspflanzen weisen gewisse Analogien auf: Die bevorzugte Bahn geht bei allen stets durch die Markstrahlen; sie stellen in erster Linie das leitende Organ der Krankheit dar, als schnellster und wirkungsvollster Ausbreitungsweg bei der Streuung im Innern des Wirtsorganismus. HARTIG (1878) schreibt über die Ausbreitung des Hallimasch:

„Die Fäden dringen in den Bastkörper ein und gelangen vorzugsweise durch die Markstrahlen in das Innere des Holzkörpers. Von den Markstrahlen aus verbreiten sie sich seitlich in die angrenzenden Tracheiden. Zarte Seitenhyphen durchbohren die Wände und lösen sie auf.“

Der Infektionsweg von *Trametes radiciperda* geht ausschließlich über die Markstrahlen ins Innere des Holzes. Das umliegende Gewebe wird dabei fast gar nicht angegriffen, sondern die zerstörende Tätigkeit beginnt erst

im Kernholz. Bei *Rosellinia quercina* kann man schon mit bloßem Auge die erst weiß, später intensiv braun gefärbten Hyphenstränge strahlenförmig in Richtung auf den Zentralkörper verlaufen sehen. Der Hallimasch entsendet dicke Myzelstränge von der *Rhizomorpha subcorticalis* aus in das Holz. Darüber hinaus dienen ihm aber auch die Harzkanäle als wichtige Leitungsbahnen. In ihnen wachsen Hyphen schnell aufwärts, weit höher, als sich die *Rhizomorpha subcorticalis* im Bast entwickeln kann. Das Zellgewebe in der Umgebung der Kanäle wird zerstört, und es entstehen zuletzt große Lücken, die oft von einem wild wuchernden Hyphengewirr vollständig erfüllt sind.

In späten Infektionsstadien treten alle dieser Erreger aus ihren spezifischen Ausbreitungsbahnen in das Grundgewebe des Wirtes hinaus und entfalten meist erst hier das Höchstmaß ihrer pathogenen Tätigkeit.

Eine andere gewebespezifische Ausbreitung von *Armillaria* und *Rosellinia* findet in der Kambialregion statt. Nach MÜNCH sucht der Pilz mit Vorliebe die sauerstoffärmste, wasserreichste Zone der Wirtspflanze auf. SCHMID untersuchte die Beziehungen verschiedener Parasiten zum Phloem und stellte fest, daß die Hyphen des Hallimasch ohne Rücksicht auf die Wirtspflanze in die Siebzellen eindringen und sie zerstören. In der Kambialzone findet man daher schon in einem relativ frühen Infektionsstadium eine Schicht verharzter Zellen, an deren Stelle später die *Rhizomorpha subcorticalis* tritt. Auch bei *Rosellinia quercina* ist die Zersetzung der Kambialregion am stärksten; die Folge ist ein schnelles Absterben der Pflanze. Die Hyphen von *Trametes radiciperda* dagegen gehen sofort in die Elemente des Holzes über und gelangen erst in späten Infektionsstadien von innen her an die Kambialzone, die auch dann noch nicht bevorzugt befallen wird.

Man sieht an den angeführten Beispielen, wie verschieden sich jeder einzelne Fall eines parasitischen Verhältnisses durch die anatomische Spezialisierung gestalten kann. Neben den anatomischen kommt aber zweifellos auch den physiologischen Infektionsvoraussetzungen eine ausschlaggebende Bedeutung zu. Denn folgte auf das Zusammentreffen von Pilz und Wirt allein stets eine Erkrankung, so könnte bei der weiten Verbreitung der parasitischen Pilze im Boden auf die Dauer wohl keine Pflanze einer Infektion entgehen. Die Frage, unter welchen physiologischen Voraussetzungen eine Infektion im Pflanzenreich zustande kommt, ist häufig diskutiert worden. So geht GÄUMANN in seiner „Infektionslehre“ auf alle Faktoren näher ein, die eine Infektion herbeiführen bzw. beeinflussen. Aus ihrer Vielzahl sollen hier deshalb nur diejenigen herausgegriffen werden, die nach dem heutigen Stand der Untersuchungen in Beziehung zu den besprochenen Wurzelkrankheiten gesetzt werden können.

Den größten Einfluß auf die Infektion besitzen die Umweltfaktoren. Da die wichtigsten von ihnen, Feuchtigkeit, Temperatur usw., durch die Witterung beeinflusst werden, so spielt die Witterung eine mittelbar entscheidende Rolle. Die Entwicklung des Erregers ist in den meisten Fällen an eine gewisse Feuchtigkeit gebunden. So ist z. B. eine hinreichende Boden-

feuchtigkeit für die Entwicklung von *Rosellina quercina* Vorbedingung. Ich zitiere HARTIG (1880):

„Eine Bedingung der üppigen Pilzentwicklung ist die Bodennässe. Nur in mit Feuchtigkeit gesättigter Luft und in anhaltend feuchtem Boden vermag sich das Myzel des Parasiten üppig zu entwickeln. Sobald ein, wenn auch nur vorübergehendes Austrocknen der oberen Bodenschichten stattgefunden hat, stirbt das fädige Mycelium ab. Die Berichte lauten daher auch übereinstimmend dahin, daß anhaltendes Regenwetter das Vertrocknen der Pflanze beschleunigt, daß auf nassem, undurchlässigem Boden die Krankheit sich besonders üppig entwickelt habe.“

Der Einfluß der Temperatur tritt hinter dem der Feuchtigkeit meist zurück. Unter optimalen Temperaturverhältnissen wird die Infektion jedoch stark beschleunigt, da der Pilz bei feuchter Wärme die größte Virulenz besitzt. Wir haben gesehen, daß *Rosellinia quercina* fast ausschließlich in regnerischen Sommermonaten auftritt und sich bei Anhalten der schlechten Witterungsverhältnisse außerordentlich schnell verbreitet. Neben der witterungsmäßigen Begünstigung des Erregers wird andererseits die Krankheitsdisposition des Wirtes mit steigender Bodenfeuchtigkeit erhöht. Die Lenticellen der jungen Eichenpflanzen entwickeln bei großer Bodennässe ein aerenchymähnliches Gewebe und schaffen dadurch selbst die Angriffstellen für den Erreger.

Für den Befall durch *Trametes radiciperda* sind stets die Bodenverhältnisse verantwortlich gemacht worden. ALBERT schreibt:

„Die auffallendsten und bedeutendsten Schäden verursacht der Wurzelschwamm in Fichten- und Kiefernbeständen auf Böden, die durch längere Freilage als Weide- und Öd- und Heide land oder durch landwirtschaftliche Benutzung ihre Eigenart als Waldboden verloren haben, also besonders in Acker- und Heideaufforstungen.“

Dasselbe bestätigen ZIMMERMANN, HARTIG, MÜNCH und andere Autoren. Über die Ursache dieser Erscheinung sind eine Reihe Untersuchungen angestellt worden. Der Boden mit seinen physikalischen und chemischen Eigenschaften umschließt gleichzeitig die Existenzbedingungen des in ihm lebenden Erregers wie der in ihm wurzelnden Wirtspflanze. So steigt die Häufigkeit der Erkrankungen auf Heide- und Ackeraufforstungen aus zweierlei Gründen rapid an, obgleich man gerade auf diesen Böden besonders gute Bestände erzielt. Einerseits führt die Steigerung der Lebensenergie der Fichte zu einer Zunahme der Infektionsanfälligkeit, d. h. ihre Disposition steigt mit der Bonität der Standorte. Wie erklärt man sich diese erhöhte Krankheitsbereitschaft? Die immer wiederkehrende Ansicht, der Pilze werde auf früherem Ackerland durch Reste des Düngers begünstigt, ist sicher nicht zutreffend, da auch Heideaufforstungen in der gleichen Weise durch den Parasiten angegriffen werden. Aus dem gleichen Grunde ist es auch sehr fraglich, ob die günstige Nitrifikation, die den Ackerbeständen eigen ist, pilzbegünstigend wirkt (HOPFFGARTEN und BODEN), denn für Heideaufforstungen können besonders günstige Stickstoffumsetzungen sicher nicht angenommen werden. Nach MÜNCH ist die Erklärung darin zu suchen, daß das Sauerstoffbedürfnis des Pilzes im Innern solcher Bäume eher befriedigt wird. Ich zitiere:

„Das Myzel ist, wie andere Holzersetzer, vom Sauerstoffgehalt des Substrates abhängig. Es wächst deshalb besonders in großporigem, schwammig erwachsenem Holz, namentlich wenn dieses zeitweise wasserarm und damit lufthaltig wird. Deshalb wird auch der luftführende Kern, wenn er nicht, wie bei *Pinus*, durch braunen Kernfarbstoff geschützt ist, und der innere Splint bevorzugt. Selbst am gleichen Baum sieht man oft einzelne, besonders breite Jahrringe verpilzt, während das langsamer gewachsene, dichtere Holz, besonders die sehr dichten Hornäste, unversehrt bleiben. Ackerbestände zeichnen sich aber gerade durch üppiges Wachstum und breitringiges Holz aus. Nach ALBERT und ZIMMERMANN ist früherer Acker- und Heideboden sehr dicht gelagert und gestattet deshalb keine tiefe Wurzelverbreitung. Die Wurzeln sind auf eine flache Oberschicht angewiesen und trocknen diese zeitweise sehr stark aus. Das Holz dürfte daher aus doppeltem Grunde oft ungewöhnlich wasserarm und luftreich werden.“

HOPFFGARTEN bestätigt diesen Befund, stellt aber darüber hinaus durch Kulturen auf Holzproben fest, daß der Porenraum nicht die alleinige Bedeutung für die Infektion besitzt, sondern daß es auf das richtige Verhältnis von Feuchtigkeit und Sauerstoff ankommt. In ausgetrocknetem Holz kann *Trametes radiciperda* nicht gedeihen. Das Optimum liegt wahrscheinlich bei dem Feuchtigkeitsgrad des Reifholzes im lebenden Stamm. Die Kulturen auf Holzproben zeigen eindeutig das bessere Wachstum auf dem Ackerfichtenholz.

Neben der erhöhten Krankheitsbereitschaft der Pflanze wird andererseits der Parasit auf den genannten Böden besonders stark pathogen. GÄUMANN (1951) führt diese Beobachtung darauf zurück, daß die Lebensdauer und Intensität der saprophytischen Keimherde hier besonders groß ist. Denn infolge der Dichtlagerung der Böden kommt es häufig zum Absterben von Wurzeln durch Ersticken; sie dienen dem Parasiten als saprophytische Nährquelle. Der Ernährungszustand des Erregers aber entscheidet über seinen parasitischen Erfolg. Zu derselben Erklärung gelangten einige dänische Forscher¹⁾ auf Grund einer Versuchsreihe über die Beziehungen zwischen der Befallshäufigkeit in den Beständen und dem Umfang, in dem diese durchforstet worden waren. Es ergab sich, daß die Anfälligkeit der Fichten in stark gelichteten Beständen gegenüber weniger stark gelichteten außerordentlich ansteigt. Die Ursache hierfür kann, wie schon erwähnt, in der großen Zahl der saprophytischen Keimherde gesucht werden, die durch starke Durchforstung entstehen. Eine andere Erklärung ist der sogenannte Schockeffekt, d. h. durch die plötzlich veränderten Licht- und Bodenverhältnisse werden die Bäume zeitweilig geschwächt und dadurch besonders anfällig.

Auch die Infektion durch den Hallimasch ist durchaus an bestimmte Vegetationszustände der Nährpflanze gebunden, d. h. seine pathogene Wirkung ist von einer besonderen, nicht immer vorhandenen Empfänglichkeit des Wirtes abhängig. Von größtem Einfluß ist der Gesundheitszustand der Nährpflanze. Bäume, deren Vitalität durch Entlaubung, Rauchschäden, Vorfäll durch Ungeziefer, Dürre usw. herabgesetzt ist, sind stets am stärksten gefährdet, und es werden unter diesen Umständen Baumarten empfänglich, die bei normalen Bedingungen vollständig immun sind. So werden nach BALTZ Eichen durch die Rhizomorphen des Hallimasch bestandweise getötet,

¹⁾ Anlässlich des Intern. Forstkongresses in Rom 1953 wurde eine Arbeit von HENRIKSEN, SPRINGFORB und JÖRGENSEN über "Fomes annosus attack in relation to grade of Thinning" referiert.

wenn sie durch vorherigen Wicklerfraß und Mehltau wiederholt ihr Laub verloren haben.

Um eine Wirtspflanze besiedeln zu können, muß sich der Erreger in erster Linie von ihr chemotropisch angezogen fühlen; er reagiert nur dann, wenn ein entsprechender *Tropismus* erfolgt. Fehlt dieser, so wächst der Parasit gleichgültig wie über ein neutrales Substrat über die Wurzel hin. Die betreffende Wirtspflanze existiert für ihn nicht, sie ist befallsresistent. THOMAS stellte eingehende Untersuchungen an, welche Faktoren eine Resistenz gegenüber dem Befall durch *Armillaria mellea* bewirken. Aus den verschiedenen Wurzelrinden der zu untersuchenden Pflanzen stellte er teils frische, teils sterilisierte Dekokte her und beimpfte sie mit Hallimaschmyzel. Der Pilz wuchs auf einigen Pflanzendekokten gut, auf anderen wenig oder gar nicht, es stellte sich jedoch keine Beziehung zwischen den Versuchsergebnissen und der Resistenz der lebenden Pflanzen ein. THOMAS nimmt daher an, daß der Resistenzfaktor nur in der lebenden, gesunden Wurzelrinde enthalten ist. In ausgepreßtem Zellsaft geht dieser Faktor vollständig verloren, so daß Untersuchungen *in vitro* zu keinem den natürlichen Verhältnissen entsprechenden Resultat führen.

Wir sehen ferner, daß die parasitischen Mikroorganismen nicht wahllos irgendwelche Pflanzenarten zu besiedeln vermögen, sondern der Kreis der Arten, den sie infizieren können, ist mehr oder weniger beschränkt. So ist *Rosellinia quercina* ausschließlich zum Befall junger Eichenpflanzen befähigt; *Trametes radiciperda* befällt nur Nadelholzarten. Nach GÄUMANN (1951) ist ein Mikroorganismus nur dann zum Parasiten geeignet, wenn er imstande ist, die Zellwände des Wirtes enzymatisch aufzulösen und den Widerstand der Wirtszelle zunächst zu ertragen und dann zu überwinden. Er muß also seinen eigenen Stoffwechsel gegenüber den Reaktionen des Wirtes durchsetzen und seine Zellenneubildung aufrechterhalten können. Nur hieraus läßt sich eine biologische Spezialisierung verstehen. Bei den besprochenen Wurzelkrankheiten war die Wirtspflanze nicht in der Lage, sich dem Eindringen des Parasiten zu widersetzen. Daß andererseits nicht jede Infektion zu einer Erkrankung führen muß, zeigt THOMAS bei dem Befall der Walnuß durch den Hallimasch. Die Pflanze bildet als Abwehrreaktion auf die herandiffundierenden Giftstoffe des Parasiten sekundäre Periderme aus: Gewebe, die schon ausgewachsen sind, werden als Reaktion auf die eindringenden Toxine wieder verjüngt und bilden außertourlich an einer unorganischen Stelle in einem unorganischen Zeitpunkt neue Periderme. Sie besitzen zwar im wesentlichen den gleichen Bau wie die natürlich angelegten, dienen aber erst in zweiter Linie als mechanische Abwehrschicht. Ihre primäre Bedeutung liegt vielmehr auf antitoxischem Gebiet. Der Hallimasch wirkt ja äußerst giftig und vermag oft schon von einem lokalen Krankheitsherd aus den ganzen Baum zu schädigen. Das induzierte Periderm bildet deshalb in erster Linie eine chemische Barriere gegen die herandiffundierenden Toxine des Parasiten und verhindert, daß die dahinterliegenden Gewebe von diesen vergiftet und in ihrer Widerstandskraft geschwächt werden.

Befallsresistent sind außerdem Pflanzen bis zu einem gewissen Grade, deren anfälliger Entwicklungsabschnitt zeitlich begrenzt ist, so daß die Chancen für das Zusammentreffen von Erreger und Wirt entsprechend vermindert werden. So sind fast ausschließlich ein- bis dreijährige Eichenpflanzen für *Rosellinia quercina* anfällig; ältere Eichen erweisen sich nur in seltenen Fällen infektionsgefährdet. Dasselbe trifft in gewissem Grade auch für Nadelhölzer zu, die in ihrer Jugend für *Armillaria mellea* weit anfälliger sind als später. MÜNCH schreibt:

„Junge, bis etwa mannshohe Kiefern und Fichten werden auch in anscheinend ungestörtem Gesundheitszustand von dem Pilz getötet. Mit zunehmendem Alter verliert sich unter günstigen Lebensbedingungen diese Anfälligkeit. Im Stangenholzalter tritt der Hallimaschschaden ganz zurück; noch ältere Bestände werden aber wieder mehr heimgesucht.“

Die vorliegende Arbeit zeigt, daß eine Vielzahl verschiedener Faktoren, sowohl anatomischer wie physiologischer Art, für das Zustandekommen einer Infektion verantwortlich gemacht werden müssen. Vor allem bei den Wurzelkrankungen findet man über die Frage der Prädisposition und Immunität bisher nur mehr oder weniger einleuchtende Theorien, ein Zeichen dafür, daß man hier ein Gebiet betritt, das sehr viele Schwierigkeiten in sich birgt. Es bleibt zukünftiger Forschung vorbehalten, die ausschlaggebenden Momente für das Zustandekommen der verschiedenen Erkrankungen weiter herauszuarbeiten. Dazu anzuregen möchte ich am Schlusse dieser Ausführungen nicht versäumen.

Zusammenfassung der Ergebnisse

1. *Rosellinia quercina* vermag den geschlossenen Korkmantel nicht zu durchdringen. Der Parasit ist bei der Infektion auf durchlässige Organe in der Wurzelrinde oder auf Wunden angewiesen. Die Infektion erfolgt durch Einzelhyphen, die die Rhizoctonienstränge aussenden. Sie infizieren vor allem die Lenticellen, die bei nassem Wetter ein lockeres Aerenchym bilden und dadurch das Eindringen des Pilzes noch stärker begünstigen. Neben diesen Durchlaßstellen dienen auch Wunden, wie sie häufig beim Absterben von Seitenwurzeln entstehen, und die Wurzelspitzen, bevor das schützende Periderm gebildet wird, als Eintrittspforten für den Parasiten. Der Weg ins Innere der Wurzel erfolgt primär durch die Markstrahlen; eine stärkere Ausbreitung des Myzels findet außerdem in der Kambialzone statt. Den Hyphen geht eine Giftwirkung voraus, die das Gewebe in ihrer Umgebung bräunt. Die Fortpflanzungsorgane werden in den Lenticellen gebildet; sie stellen somit die Eintritts- und Austrittspforte des Pilzes dar.

2. *Trametes radiciperda* ist nicht auf Wunden, Kontaktstellen oder anatomisch vorgebildete Organe in der Wurzelrinde angewiesen. Zwar befällt sie der Parasit, und die Infektion schreitet an solchen Stellen besonders schnell fort, aber auch die vollständig verkorkten Zellen der Borke vermag er mit Leichtigkeit zu durchwachsen, nachdem er sie zuvor

durch fermentative Einwirkung geschwächt hat¹⁾). Die Infektion erfolgt durch Einzelhyphen, die sich direkt in die Wandungen einbohren; auf diese Weise entstehen zahllose Löcher in den Peridermzellen. Jeweils zwischen den einzelnen Borkenschuppen vereinigen sich die Hyphen und bilden eine hauchdünne weiße Myzelhaut. Die Leitung der Hyphen ins Innere des Holzkörpers übernehmen die Markstrahlen; das durchdrungene Gewebe sowie das Kambium verändern sich dabei nur wenig; die Zersetzungserscheinungen beginnen erst im Kernholz. Die Fruchtkörper entstehen in den stark aufgetriebenen Lenticellen, häufiger zwischen den Rindenschuppen an jeder beliebigen Stelle der Wurzeloberfläche. Die Eintrittspforten dienen dem Parasiten auch hier gleichzeitig als Austrittsstellen.

3. *Armillaria mellea* ist in keiner Weise auf ein Organ in der Wurzelrinde oder auf Wunden spezialisiert; ihr Befall bietet für den Parasiten keine besonderen Vorteile; er durchbricht die intakte Körperhaut an jeder beliebigen Stelle mit der gleichen Leichtigkeit. Die Infektion erfolgt durch einen massiven Angriff der Hyphenstränge, die sich keilartig in das Gewebe vorschieben. Starke Vergiftungserscheinungen gehen der Strangspitze voraus. Im Bast und Holzkörper dienen vor allem Markstrahlen und Harzkanäle als Infektionsweg. Die Kambialzone sowie der Bast werden dabei getötet und verharzen. Die Bildung der Fruchtkörper geschieht durch die *Rhizomorpha subterranea*, d. h. durch dasselbe Organ, welches die Infektion übernimmt.

4. Für die besprochenen Wurzelinfektionen ist nicht allein die Anatomie der Wurzel verantwortlich, sondern der physiologischen Abwehrbereitschaft der Wirtspflanze und der Virulenz des Erregers kommt eine ebenso große Bedeutung bei dem Zustandekommen einer Infektion zu. Die physiologischen Voraussetzungen einer Erkrankung werden durch verschiedene Faktoren wie Klima, Bodenbeschaffenheit und andere Umstände bestimmt.

Literaturverzeichnis

- ALBERT, R. und ZIMMERMANN, A., 1907: Besteht ein Zusammenhang zwischen Bodenbeschaffenheit und Wurzelerkrankung der Kiefer auf aufgeforstetem Ackerland? Z. Forst- u. Jagdwesen 39, 283, 353.
- APPEL, O., 1915: Disease resistance in plants. Science 41, 773.
- BALTZ, F., 1913: Das Absterben der Eichen in Westfalen. Dt. Forstztg. 28, 537, 887.
- BARY, A. DE, 1884: Vergleichende Morphologie und Biologie der Pilze, Mycetozoen und Bakterien. Leipzig.
- —, 1868: Morphologie und Physiologie der Pilze. Leipzig.
- BAVENDAMM, W., 1928: Neue Untersuchungen über die Lebensbedingungen holzzerstörender Pilze. Ein Beitrag zur Frage der Krankheitsempfänglichkeit unserer Holzpflanzen. Zbl. f. Bakt. 75, 426, 503.
- BERNARD, N., 1909: L'évolution dans la symbiose. Les orchidées et leurs champignons commensaux. Ann. Sc. Nat. 9. série Bot. T. IX, p. 1—196.
- BODEN, F., 1904: Die Stockfäule an Fichte. Hameln.
- BOYCE, J. S., 1948: Forest Pathology. 2. Aufl. New York u. London.
- BREFELD, O., 1889: Untersuchungen aus dem Gesamtgebiet der Mycologie. Heft 8. Leipzig.

¹⁾ Vgl. dazu den Vorbehalt S. 245 Fußnote.

- BURGEFF, H., 1909: Die Wurzelpilze der Orchideen. Jena.
- CARTWRIGHT, K., 1929: A satisfactory method of staining fungal mycelium in wood sections. *Ann. Bot.* **43**, 412.
- DAY, W. R., 1927: The parasitism of *Armillaria mellea* in relation to conifers. *Quart. J. Forestry* **21**, 9—21.
- FAWCETT, H. S., 1923: Gum diseases of citrus trees in California. *Calif. Agr. Expt. Sta. Bull.* **360**, 370.
- FREY-WYSSLING, A., 1952: Kontrasteffekt dicker Objekte im Phasenkontrastmikroskop. *Naturwiss.* **39**, 145.
- GÄUMANN, E., 1926: Vergleichende Morphologie der Pilze. Jena.
- —, 1951: Pflanzliche Infektionslehre. 2. Aufl. Basel.
- GOEBEL, K., 1893: Pflanzenbiologische Schilderungen. II/2, 261. Marburg.
- GUTTENBERG, H. v., 1940: Der primäre Bau der Angiospermenwurzel. *Linsbauers Handb. d. Pflanzenanatomie*, Bd. VIII.
- HARTIG, R., 1874: Wichtige Krankheiten der Waldbäume. Berlin.
- —, 1878: Die Zersetzungserscheinungen des Holzes der Nadelhölzer und der Eiche. Berlin.
- —, 1880: Untersuchungen aus dem Forstbotanischen Institut I. Berlin.
- —, 1882: Lehrbuch der Baumkrankheiten. Berlin.
- —, 1900: Lehrbuch der Pflanzenkrankheiten. 3. Aufl. Berlin.
- HOLDHEIDE, W., 1951: Anatomie mitteleuropäischer Gehölzrinden. *Handb. d. Mikrosk. i. d. Technik* **5/1**.
- HOPFFGARTEN, E. H. v., 1933: Beiträge zur Kenntnis der Stockfäule. *Phytopath. Z.* **6**, 1—48.
- KISSER, J., 1939: Die botanisch-mikrotechnischen Schneidemethoden. *ABDERHALDEN, Handb. d. biol. Arbeitsmeth.* **IV**, 391.
- KUSANO, S., 1910: *Gastrodia elata* and its symbiotic association with *Armillaria mellea*. *J. Col. Agr., Imp. Univ. Tokyo* **4**, 1—66.
- KÜSTER, K., 1925: Pathologische Pflanzenanatomie. 3. Aufl. Jena.
- LIESE, W., 1954: Elektronenmikroskopische Untersuchungen an verblautem Kiefernholz. *Holzforschung* **7**, 97.
- MAC DOUGAL, D. T., 1899: Symbiosis and saprophytisme. *Ann. Bot.* **8**.
- MÄTTES, 1911: Mitteilungen über den Bau und das Leben der Fichtenwurzeln und Untersuchungen über die Beeinflussung des Wurzelwachstums durch wirtschaftliche Einwirkungen. *Allg. Forst- u. Jagdztg.* **87**, 1.
- MÜNCH, E., 1932: Hymenomyceten. *SORAUER, Handb. der Pflanzenkrankh.* **2**. Paul Parey, Berlin.
- NEGER, F. W., 1908: Das Tannensterben in den sächsischen und anderen deutschen Mittelgebirgen. *Tharandter Forstl. Jb.* **58**, 201—225.
- —, 1919: Die Krankheiten unserer Waldbäume. Stuttgart.
- RENNERFELT, E., 1949: The effect of soil organism on the development of *polyporus annosus*, the root rot fungus. *Oikos* **1/1**.
- ROMEIS, B., 1948: Mikroskopische Technik. 15. Aufl. München.
- SATIN, S. v., 1922: Lenticellen als Eintrittspforten für parasitische Pilze. *Ber. Dt. Bot. Ges.*, **14. Jahrg.**, **15**, 310—313.
- SCHENCK, 1889: Über das Aerenchym, ein dem Kork homologes Gewebe. *Pringsheims Jb. wiss. Bot.* **XX**, 566.
- SCHMID, R., 1954: Über die histologische Spezialisierung von Blatt- und Rindenpilzen, mit besonderer Berücksichtigung ihrer Beziehungen zum Phloem. *Phytopathol. Z.* **21**, 407.
- SCHNEIDER, H. und ZIMMERMANN, A., 1922: Die botanische Mikrotechnik. 2. Aufl. Jena.
- SORAUER, P., 1928: Handbuch der Pflanzenkrankheiten II u. III. 5. Aufl. Berlin.
- STRASBURGER, usw., 1953: Lehrbuch der Botanik für Hochschulen. 26. Aufl. Stuttgart.
- THOMAS, H. E., 1934: Studies on *Armillaria mellea* (Vahl.) Quel., infection, parasitism, and host resistance. *J. Agr. Res.* **48**, 187.

- TISDALE, W. B., 1917: Flaxwilt: A study of the nature and inheritance of wilt resistance. J. Agr. Res. 11, 573.
- TSCHERMAK-WOESS, E. und DOLEZAL, R., 1953: Durch Seitenwurzelbildung induzierte und spontane Mitosen in den Dauergeweben der Wurzel. Österr. Bot. Z. 100, 358.
- TUBEUF, C. v., 1898: Lenticellenwucherungen (Aerenchym) an Holzgewächsen. Forstl.-Nat. Z. 405.
- VOLZ, G., 1952: Elektronenmikroskopische Untersuchungen über die Porengröße pflanzlicher Zellwände. Zbl. Mikrosk. Forsch. u. Meth. 7, 223—294.
- WAKSMAN, S. A., 1952: Soil microbiology. Baltimore.
- WHITE, J. H., 1919: On the biology of *Formes applanatus* (Pers.) Wallr. Roy. Canad. Inst. Trans. 12, 133.
- WUTZ, A., 1955: Anatomische Untersuchungen über System und periodische Veränderungen der Lenticellen. Bot. Studien 4, 43—72.
- ZELLER, S. M., 1926: Observations on infection of apple and prune roots by *Armillaria mellea*. Phytopathology 16, 479.
- ZIMMERMANN, A., 1908: Untersuchungen über das Absterben des Nadelholzes in der Lüneburger Heide. Z. Forst- u. Jagdwesen 40, 357.

Aus dem Institut für spezielle Botanik der Eidg. Technischen Hochschule
in Zürich

Direktor: Prof. Dr. E. Gäumann

Über den Einfluß der Fusarinsäure auf den Gaswechsel von *Saccharomyces cerevisiae* Hans.

Von

PIERRE REUSSER und STEPHI NAEF-ROTH

Mit 5 Abbildungen

Inhalt: I. Einleitung. — II. Methodik. — III. Experimenteller Teil. 1. Der Einfluß der Fusarinsäure auf O_2 -Aufnahme und CO_2 -Abgabe der Hefe. a) Der Verlauf der Gaswechselhemmung als Funktion der Zeit. b) Der Einfluß der Konzentration. 2. Der Einfluß der Fusarinsäure auf Gärung und endogene Atmung der Hefe. a) Die Hemmung der Gärung unter anaeroben Bedingungen. b) Die Hemmung der endogenen Atmung. 3. Die Abhängigkeit der Wirkung von der Dissoziation der Fusarinsäure. a) pH-Abhängigkeit. b) pH-Reversibilität. 4. Die Aufnahme der Fusarinsäure durch die Hefezellen. 5. Der Einfluß der Fusarinsäure auf lyophilisierte Hefe. — Zusammenfassung und Schlußfolgerungen. — Summary. — Literaturverzeichnis.

I. Einleitung

Die Fusarinsäure wurde als eine Pyridincarbonsäure der Bruttoformel $C_{10}H_{13}O_2N$ (5 n-Butyl-picolinsäure) erstmals von YABUTA, KAMBE und HAYASHI (1934) beschrieben. Sie kann aus Kulturfiltraten verschiedener Welkeparasiten, so auch aus Kulturen von *Fusarium lycopersici* Sacc. isoliert werden und wurde durch PLATTNER, KELLER und BOLLER (1954) synthetisiert.

Über die biologische Wirkung der Fusarinsäure ist folgendes bekannt (GÄUMANN, NAEF-ROTH und KOBEL, 1952): sie hemmt das Wachstum verschiedener grampositiver und gramnegativer Bakterien in einem Konzentrationsbereich von $2,5 \cdot 10^{-3}$ bis $2,5 \cdot 10^{-4}$ Mol/Liter; ihre antibakterielle Wirkung ist also gering und unspezifisch. Sie vermag ferner auch Pilze am Wachstum zu verhindern: die LD 50 für Brandsporen von *Ustilago zeae* (Beckm.) Ung. wird bei einer Konzentration von 10^{-4} Mol/Liter erreicht; das Myzelwachstum von *Rhizoctonia solani* Kühn (Stamm Grodzinski) wird im Test nach GROSSER und FRIEDRICH (1947) durch eine 10^{-3} molare Lösung noch meßbar gehemmt. — Im Welketest mit Tomatensprossen ruft Fusarin-

säure in ungefähr gleicher Dosierung wie Lycomarasmin (Dosis minima 158 mg/kg) Schädigungen im Stengelgewebe und in den Blattspreiten hervor, wobei die Ausprägung der Schadbilder vom pH-Wert der verabreichten Toxinlösung abhängt. Die Welkesymptome verschieben sich je nach dem Dissoziationsgrad der Säure, indem durch dieselbe Toxinmenge beim höheren pH (6,2) die Blattgewebe, beim tieferen pH (4,3) jedoch hauptsächlich die über den Leitungsbahnen liegenden Stengelgewebe nekrotisiert werden. — Auch die Welkewirkung des Toxins ist unspezifisch, da Gramineen, Papilionaceen und Solanaceen ähnliche Vergiftungssymptome zeigen, wobei sich allerdings die Wirkungsschwelle je nach Versuchspflanze erheblich verschiebt. —

Auf das Blattgewebe von Tomaten wirkt die Fusarinsäure als starkes Osmosegift ein, indem der Schwellenwert der Giftwirkung durch eine $2,5 \cdot 10^{-5}$ molare Lösung erreicht wird (GÄUMANN, NAEF-ROTH, REUSSER und AMMANN, 1952). Ferner wurde in einer vorangehenden Arbeit (NAEF-ROTH und REUSSER, 1954) über die atmungshemmende Wirkung der Fusarinsäure auf Tomatenblattgewebe berichtet. Analog dazu beobachten TAMARI und KAJI (1952) eine Hemmung der Atmung von Reiskeimlingen unter der Wirkung des Toxins. Sie stellen fest, daß Fusarinsäure die Funktion der Katalase, Peroxydase usw. in pflanzlichen Geweben verhindert, während sie Enzysysteme, die keine Metallionen enthalten, in ihrer Funktion nicht zu beeinträchtigen vermag, und schließen daraus, daß die Giftwirkung der Fusarinsäure auf ihrem Chelierungsvermögen mit den lebenswichtigen Metallionen des Plasmas beruht. Zum gleichen Schluß gelangt DEUEL (1954).

An Hand der Gaswechseluntersuchungen mit *Saccharomyces cerevisiae* Hans., der Bäckerhefe, sollen als Beitrag zur Klärung der Wirkungsweise der Fusarinsäure nun folgende Fragen herausgegriffen und näher untersucht werden:

1. Wirkt Fusarinsäure auf die Atmung der Hefe in gleicher Weise wie auf die Atmung von Tomatenblättern und Reiskeimlingen hemmend ein?
2. In welcher Weise wird unter aeroben und anaeroben Bedingungen das Gärungsvermögen der Hefe durch Fusarinsäure beeinflusst?
3. Haben Veränderungen des pH-Wertes der Fusarinsäurelösungen einen ähnlichen Einfluß auf die Wirksamkeit des Toxins, wie sie bei der Blattatmung und in den Welkeversuchen festgestellt werden konnten, und sind die unter dem Einfluß des Toxines in der Hefezelle ablaufenden Reaktionen pH-reversibel?
4. Wie hängt die von den Hefezellen aufgenommene Fusarinsäuremenge vom Dissoziationsgrad der Säure ab? Verändert sich mit einer Verschiebung des pH-Wertes in der Suspensionsflüssigkeit auch das Eindringungsvermögen der Fusarinsäure?
5. Wie verhalten sich Sauerstoffaufnahme und Kohlensäureabgabe der lyophilisierten Hefe unter Einwirkung der Fusarinsäure?

II. Methodik

Die Fusarinsäure verschiedener biologischer Provenienz und das synthetisierte Produkt unterscheiden sich in der Welkewirkung auf Tomaten nicht (GÄUMANN, NAEF-ROTH und KOBEL, 1952). Trotzdem scheinen in diesen Stoffgruppen in vivo verschiedene nahe verwandte Verbindungen vorzukommen. Um ein einheitliches Ausgangsmaterial zu haben, verwendeten wir synthetische Fusarinsäure. Wir danken Herrn Prof. Dr. Pl. A. PLATTNER und Herrn Dr. A. BOLLER (Basel), sowie Herrn Dr. E. HARDEGGER und Herrn E. NIKLES (Zürich) auch an dieser Stelle bestens für die Überlassung der für die Versuche benötigten Substanzmengen.

Als Versuchsobjekt diente Bäckerpreßhefe (*Saccharomyces cerevisiae* Hans.) der Hefefabrik Klipfel und Co., Rheinfelden, die einmal wöchentlich direkt ab Fabrik bezogen und bei 3 °C aufbewahrt wurde. 24 Stunden vor Versuchsbeginn wurde die Hefe in destilliertem Wasser gewaschen, zentrifugiert und in einer Suspensionsdichte von 1–2 ‰ in Phosphatpuffer aufgeschwemmt. (Weitere Einzelheiten siehe RIEDER, 1951, S. 540.)

Die Gaswechselmessung erfolgte nach dem manometrischen Prinzip (WARBURG, 1926; DIXON, 1943; UMBREIT, BURRIS und STAUFFER, 1949). Die Versuche wurden bei 30 °C durchgeführt, wobei die Temperaturabweichungen des Thermostaten 0,05 °C nicht überstiegen. Die pH-Messungen erfolgten auf elektrometrischem Wege mittels einer Glaselektrode.

III. Experimenteller Teil

1. Der Einfluß der Fusarinsäure auf O₂-Aufnahme und CO₂-Abgabe der Hefe

Den ersten Versuchsreihen lagen die folgenden Fragen zugrunde: Wie verändert sich der Gaswechsel der Hefe nach der Vergiftung mit synthetischer Fusarinsäure? Werden sowohl O₂-Aufnahme wie CO₂-Abgabe durch die Vergiftung vermindert, und, wenn ja, bei welcher Konzentration tritt eine 50%ige Gaswechselhemmung ein?

a) Der Verlauf der Gaswechselhemmung als Funktion der Zeit

Die erste Versuchsfrage lautet: Welchen Veränderungen unterliegt der Gaswechsel einer mit Fusarinsäure versetzten Hefesuspension in den ersten Stunden nach der Vergiftung?

Versuchsanordnung: Einer Hefesuspension von 1 ‰ in Phosphatpuffer von pH 6,0 wird bei einer Versuchstemperatur von 30 °C 1 ‰ Glukose 30 Min. vor Meßbeginn und Fusarinsäure in den Konzentrationen von $5 \cdot 10^{-3}$ und $7,5 \cdot 10^{-3}$ Mol/Liter 45 Min. nach Meßbeginn zugegeben. Der Verlauf der Gaswechselhemmung ist in Abb. 1 wiedergegeben.

Abbildung 1 läßt deutlich erkennen, daß sowohl die Sauerstoffaufnahme wie die Kohlensäureabgabe der Hefe durch den Zusatz von Fusarinsäure ge-

hemmt werden. Schon 15 Min. nach dem Vergiften ist ein Gleichgewichtszustand erreicht, in welchem die Kurven wieder linear verlaufen, jedoch in ihrer Steigung wesentlich von den Kontrollkurven der nicht vergifteten Hefe abweichen. Wird der Kurvenverlauf bei Hefe mit demjenigen bei Tomatenblattgewebe verglichen, so zeigt sich, daß die Zeitspanne bis zur Einstellung des Gleichgewichtes bei Hefe geringer ist als beim Blattgewebe. Das Toxin umspült den Einzeller besser und vermag schneller einzudringen als in das Gewebe.

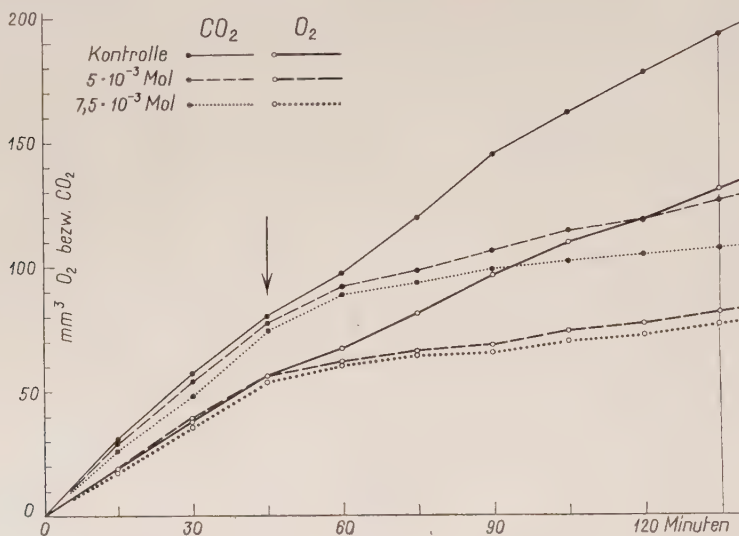


Abb. 1. Der Einfluß der Fusarinsäure auf den Gaswechsel der Hefe. Abszisse: Zeit in Min. Ordinate: O_2 -Aufnahme bzw. CO_2 -Abgabe in mm^3 . Zusatz der Fusarinsäure ↓

b) Der Einfluß der Konzentration

Die zweite Versuchsfrage heißt: Welches ist der wirksame Konzentrationsbereich der Fusarinsäure, wenn Hefe bei einem pH-Wert von 6,0 vergiftet wird, und in welcher Weise verschiebt sich der Atmungsquotient (RQ)? Ist es möglich, die Wirkung auf die O_2 -Aufnahme und die Wirkung auf die CO_2 -Abgabe auseinanderzuhalten?

Versuchsanordnung: Temp. $30^\circ C$; Dichte der Hefesuspension 1 ‰; Phosphatpuffer pH 6,0; Zusatz von 1 ‰ Glukose 30 Min. vor, von Fusarinsäure 35 Min. nach Versuchsbeginn. Die Werte wurden aus je sieben Parallelversuchen ermittelt. Die Streuungen wurden nach LINDER (1951) berechnet.

Aus den Werten der Tabelle 1 (und Abb. 2) geht hervor, daß

1. die atemungshemmende Wirkung der Fusarinsäure im Bereiche von $5 \cdot 10^{-4}$ bis 10^{-2} Mol/Liter konzentrationsabhängig ist; bei pH 6,2 wird die 50%ige Hemmung des Sauerstoffverbrauches durch eine Fusarinsäurekonzentration von $4 \cdot 10^{-3}$ Mol/Liter ausgelöst;

Tabelle 1

O₂-Aufnahme und CO₂-Abgabe der Hefe nach Zusatz von
Fusarinsäure verschiedener Konzentrationen
pH 6,2 ± 0,1

Fusarinsäure Mol/Liter	mm ³ O ₂ /Std. ± s	mm ³ CO ₂ /Std. ± s	RQ CO ₂ /O ₂
Kontrolle	51,2 ± 4,8	80,0 ± 7,7	1,57
5 · 10 ⁻⁴	50,5 ± 2,2	85,5 ± 3,3	1,70
7,5 · 10 ⁻⁴	52,4 ± 2,7	90,8 ± 3,0	1,73
10 ⁻³	52,9 ± 3,3	93,1 ± 6,4	1,76
1,25 · 10 ⁻³	51,6 ± 4,1	94,2 ± 3,3	1,83
2,5 · 10 ⁻³	37,1 ± 2,6	79,3 ± 7,6	2,14
5 · 10 ⁻³	23,9 ± 4,0	41,8 ± 4,4	1,75
7,5 · 10 ⁻³	11,1 ± 1,8	13,7 ± 1,4	1,23
10 ⁻²	5,2 ± 2,3	6,4 ± 2,5	1,23

2. sich bei niederen Konzentrationen (5 · 10⁻⁴ bis 1,3 · 10⁻³ Mol/Liter) eine gesicherte Steigerung der CO₂-Produktion feststellen läßt, während bei hohen Konzentrationen (5 · 10⁻³ bis 10⁻² Mol/Liter) auch das Gärungsvermögen der Hefe stark beeinträchtigt wird. Eine 50%ige Hemmung der CO₂-Abgabe wird bei 5 · 10⁻³ Mol/l Fusarinsäure erreicht.

O₂-Aufnahme und CO₂-Abgabe werden unterschiedlich gehemmt; der Atmungsquotient verschiebt sich mit zunehmender Vergiftung, indem er bei niederen Konzentrationen im Vergleich zum Kontrollwert (1,57) auf maximal 2,14 ansteigt, um dann bei sehr hohen Konzentrationen stark abzusinken bis auf 1,23, also unter den Kontrollwert.

Wie verläuft nun die Sauerstoffaufnahme und die Kohlensäureabgabe der Hefe nach Zusatz von Fusarinsäure bei einem tieferen pH-Wert der Suspensionsflüssigkeit von 4,5? Werden beide Vorgänge in gleicher Art von der Toxinkonzentration bestimmt, stellt sich eine entsprechende Steigerung der CO₂-Produktion ein, und in welchem Sinne verschiebt sich der Atmungsquotient bei dieser Versuchsanordnung?

So soll die Beantwortung der dritten Forschungsfrage klären, ob und wie weit sich die Gaswechselhemmung durch eine Verschiebung des pH-Wertes der Suspensionsflüssigkeit verändert.

Versuchsanordnung: Temperatur 30 °C; Dichte der Hefesuspension 1 %; Phosphatpuffer pH 4,5; Zusatz von 1 % Glukose 30 Min. vor, von Fusarinsäure 35 Min. nach Meßbeginn. Die Werte der Tabelle 2 wurden aus je fünf Parallelversuchen gemittelt.

Die Werte der Tabelle 2 (graphisch dargestellt in Abb. 2) zeigen, daß auch bei einem pH-Wert von 4,5, bei welchem die Fusarinsäure praktisch in undissoziierter Form vorliegt,

1. ihre atmungshemmende Wirkung konzentrationsabhängig ist; doch liegt diejenige Konzentration, die eine 50%ige

Tabelle 2

O₂-Aufnahme und CO₂-Abgabe der Hefe nach Zusatz von Fusarinsäure verschiedener Konzentrationen
pH 4,5 ± 0,2

Fusarinsäure Mol/Liter	mm ³ O ₂ /Std. ± s	mm ³ CO ₂ /Std. ± s	RQ CO ₂ /O ₂
Kontrolle	48,3 ± 4,3	83,3 ± 8,1	1,72
10 ⁻⁴	48,1 ± 7,0	93,3 ± 6,2	1,94
2,5 · 10 ⁻⁴	47,7 ± 4,2	99,8 ± 6,6	2,09
5 · 10 ⁻⁴	39,5 ± 2,0	95,1 ± 4,7	2,41
7,5 · 10 ⁻⁴	27,7 ± 1,3	94,7 ± 5,1	3,42
10 ⁻³	25,7 ± 1,8	80,9 ± 3,4	3,15
2,5 · 10 ⁻³	12,8 ± 0,8	22,0 ± 3,6	1,72
5 · 10 ⁻³	5,3 ± 0,9	8,6 ± 1,0	1,62
10 ⁻²	3,5 ± 0,1	5,6 ± 0,9	1,60

Hemmung des Sauerstoffverbrauches bewirkt, wesentlich tiefer als in den Versuchen bei pH 6,2, nämlich bei 10⁻³ Mol/Liter (gegenüber 4 · 10⁻³ Mol/Liter);

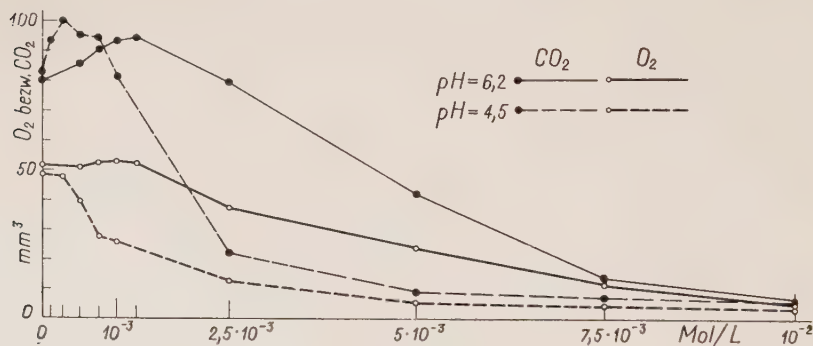


Abb. 2. O₂-Aufnahme und CO₂-Abgabe der Hefe nach Zusatz von Fusarinsäure verschiedener Konzentrationen bei pH 6,2 und pH 4,5.

Abszisse: Fusarinsäure in Mol/Liter. Ordinate: mm³ O₂ bzw. CO₂ je Stunde

2. eine gesicherte Steigerung der CO₂-Produktion bei niederen Konzentrationen zu beobachten ist, analog, aber ausgeprägter als in den Versuchen bei pH 6,2, und zwar liegt hier auch der die CO₂-Abgabe steigernde Konzentrationsbereich wesentlich tiefer (10⁻⁴ bis 7,5 · 10⁻³ Mol/Liter). Eine 50%ige Hemmung der CO₂-Abgabe tritt bei einer Konzentration von 1,8 · 10⁻³ Mol/Liter ein. Auch bei dieser Versuchsanordnung werden O₂-Aufnahme und CO₂-Abgabe verschieden stark gehemmt, und der Atmungsquotient verschiebt sich mit der Toxin-konzentration, indem er vom Kontrollwert (1,72) bei niederen Gift-konzentrationen erst ansteigt bis 3,42, um nachher bei starker Hemmung des Gaswechsels etwas unter den Kontrollwert auf 1,60 zu sinken.

Sowohl Atmungs- hemmung wie Hemmung der CO₂-Abgabe sind einerseits abhängig von der Konzentration der Fusarinsäure, ander-

seits aber auch von ihrem Dissoziationsgrad, indem durch gleiche Konzentration beim tiefen pH-Wert, also bei geringer Dissoziation der Fusarinsäure-Moleküle, eine stärkere Hemmung ausgelöst wird. Über die Wechselwirkung zwischen Konzentration und Dissoziation der Fusarinsäure und über den Einfluß einer pH-Veränderung während der Einwirkungszeit der Fusarinsäure wird das 3. Kapitel Aufschluß geben.

Zunächst soll den Ursachen für die Steigerung der CO_2 -Produktion, die bei beiden pH-Werten gleicherweise festgestellt werden kann, nachgegangen werden. Zur Erklärung dieser gesteigerten Kohlensäureproduktion können folgende Hypothesen herangezogen werden:

a) Bei schwachen Konzentrationen hemmt die Fusarinsäure nur die O_2 -Aufnahme, was auf Grund des sog. Pasteur-Effektes (Hemmung des anaeroben Kohlenhydratabbaus durch Sauerstoff) zu einer Steigerung der CO_2 -Abgabe führt. Bei höheren Konzentrationen tritt eine Plasmachädigung auf, die die gesamte Zellaktivität vermindert.

b) Die in die Zelle eintretende Fusarinsäure wird durch allmähliche Decarboxylierung deaktiviert, die bei schwachen Konzentrationen in einer gesteigerten CO_2 -Produktion im Manometerversuch erfaßt werden kann. So findet SANWAL (1955) auf Grund von Untersuchungen mit radioaktiver Fusarinsäure, daß in Tomatenpflanzen eine Decarboxylierung des Toxins eintritt.

Um der Natur dieser gesteigerten Kohlensäureproduktion näher zu kommen, werden in der Folge die Vorgänge bei der Einwirkung der Fusarinsäure auf die reine Atmung (endogene Atmung) und auf die reine Gärung (unter anaeroben Bedingungen) näher untersucht.

2. Der Einfluß der Fusarinsäure auf Gärung und endogene Atmung der Hefe

a) Die Hemmung der Gärung unter anaeroben Bedingungen

Die vierte Versuchsfrage lautet: Wird nach Zusatz von Fusarinsäure die anaerobe Gärung gehemmt und ist auch unter anaeroben Bedingungen bei gewissen Konzentrationen eine übernormale Steigerung der CO_2 -Abgabe festzustellen?

Der Verlauf der anaeroben Gärung wurde in einer Stickstoffatmosphäre unter folgenden Bedingungen untersucht:

Versuchsanordnung: Einer 1‰igen Hefesuspension wurde 1‰ Glukose 20 Min. vor Meßbeginn zugesetzt. Die Fusarinsäure wurde 35 Min. nach Meßbeginn aus dem Einsatz in den Hauptraum gekippt. Versuchstemperatur 30°C ; pH-Wert der Suspensionsflüssigkeit (Phosphatpuffer) 4,5. Die Gefäße wurden mit Stickstoff beschickt, den eine Vorbehandlung mit alkalischem Pyrogallol und gelbem Phosphor von Sauerstoffspuren befreite.

Tabelle 3

Der Einfluß der Fusarinsäure
auf die Gärung der Hefe
unter Sauerstoff-Ausschluß

Fusarinsäure Mol/Liter	Hemmung der CO ₂ -Abgabe in % der Kontrolle
10^{-4}	$0,6 \pm 0,5$
$2,5 \cdot 10^{-4}$	$2,5 \pm 1,5$
$5 \cdot 10^{-4}$	$22,0 \pm 6,7$
$7,5 \cdot 10^{-4}$	$40,3 \pm 7,5$
10^{-3}	$54,2 \pm 5,7$
$2,5 \cdot 10^{-3}$	$94,7 \pm 1,3$

Die Resultate sind in Tabelle 3 aufgeführt (Meßintervall 60. bis 120. Minute nach Meßbeginn) und zeigen, daß unter Sauerstoffausschluß das Gärungsvermögen der Hefe ebenfalls in starkem Maße gehemmt wird. Unter der Wirkung der Fusarinsäure wird also, wie schon aus Tabelle 1 und Abb. 2 hervorgeht, neben der Atmung auch die Gärung blockiert. Die 50%ige Hemmung der CO₂-Abgabe wird in diesem Versuch bei einer Fusarinsäurekonzentration von 10^{-3} Mol/

Liter erreicht, während unter aeroben Bedingungen bei gleichem pH $1,8 \cdot 10^{-3}$ Mol/Liter eine 50%ige Hemmung der CO₂-Abgabe verursachen. Der für die Blockierung der CO₂-Produktion wirksame Konzentrationsbereich ist also unter aeroben und anaeroben Bedingungen vergleichbar. Eine Steigerung der CO₂-Abgabe, analog den in Abbildung 2 dargestellten Versuchen, wurde jedoch unter anaeroben Bedingungen nicht festgestellt. Auch niedrigere Toxinkonzentrationen führen bei pH 4,5 (und in einem parallelen Versuch auch bei pH 5,2) in einer Stickstoffatmosphäre zu keiner Steigerung des Gärungsvermögens, im Gegensatz zu dem Vorgang, der sich bei der aeroben Versuchsanordnung bei pH 4,5, wie bei pH 6,0, unter Einwirkung vergleichbarer Konzentrationen abspielt.

Ob sich bei der Kontrolle der endogenen Atmung vergifteter Hefe in einem bestimmten Konzentrationsbereich eine Steigerung der CO₂-Abgabe und damit eine Verschiebung des Atmungsquotienten ergibt, wird die folgende Versuchsreihe zeigen.

b) Die Hemmung der endogenen Atmung

Die Eigenatmung der Hefe, die ohne zusätzliche C-Quelle (Glukose), also durch den Verbrauch der Reservestoffe gesteuert wird, besitzt im allgemeinen einen Atmungsquotienten $RQ = 1$ und ist viel geringer als die Glukose-Veratmung. Sie kann mit der Atmung des Tomatenblattgewebes verglichen werden (NAEF-ROTH und REUSSER, 1954).

Die folgende fünfte Versuchsreihe soll klären, ob nach Zusatz von Fusarinsäure bei der endogenen Atmung eine analoge Wirkung zu beobachten ist wie bei der Glukose-Veratmung, und ob es möglich ist, bei der reinen Atmung die von SANWAL (1955) gefundene Decarboxylierung der Fusarinsäure in einer Steigerung der CO₂-Abgabe zu erfassen.

Versuchsanordnung: Die Hefe wurde gewaschen, zentrifugiert, in destilliertem Wasser aufgeschwemmt und 24 Stunden bei 20 °C stehengelassen. Als 4%ige Suspension gelangte sie in die Manometergefäße. Versuchstemp. 30 °C, Phosphatpuffer pH 4,5. Die Fusarinsäure wurde

35 Min. nach Versuchsbeginn zugesetzt. (Meßintervall 60. bis 120. Minute nach Versuchsbeginn.)

Tabelle 4

Die Wirkung der Fusarinsäure auf die endogene Atmung

Fusarinsäure Mol/Liter	mm ³ O ₂ /Std. ± s	mm ³ CO ₂ /Std. ± s	RQ CO ₂ /O ₂
Kontrolle	25,2 ± 2,7	25,8 ± 2,8	1,08
10 ⁻³	25,2 ± 3,7	24,9 ± 5,1	0,98
2,5 · 10 ⁻³	28,6 ± 5,1	29,3 ± 5,6	1,03
5 · 10 ⁻³	16,4 ± 5,4	17,9 ± 4,4	1,09
7,5 · 10 ⁻³	10,3 ± 4,0	9,7 ± 3,8	0,94
10 ⁻²	7,8 ± 2,2	9,2 ± 2,0	1,18
2 · 10 ⁻²	3,0 ± 1,5	2,7 ± 1,5	0,90

Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 zusammengestellt. Sowohl Sauerstoffaufnahme wie CO₂-Abgabe erfahren eine konzentrationsabhängige Hemmung, ohne daß eine Steigerung der CO₂-Abgabe eintritt. Der Atmungsquotient liegt um 1; seine geringen Schwankungen erklären sich durch die Versuchsstreuung, da bei hohen Konzentrationen der Gaswechsel auf ein Minimum zurückgedrängt wird und sich somit der Meßfehler stark erhöht.

Da weder im Verlauf der anaeroben Gärung noch bei der reinen Atmung eine Erhöhung der CO₂-Abgabe festzustellen ist, liegt der Schluß nahe, daß die bei der aeroben Glukoseverarbeitung auftretende Steigerung der CO₂-Abgabe bei Toxinkonzentrationen, die unmittelbar im Bereich der Wirkungsschwelle liegen, auf den Pasteur-Effekt zurückzuführen ist. Die von SANWAL beschriebene Decarboxylierung der Fusarinsäure müßte nach unseren Resultaten entweder nur bei der Glukoseverarbeitung unter aeroben Bedingungen auftreten oder aber wesentlich längere Versuchszeiten voraussetzen, wie das bei SANWALS Versuchen an Tomatenpflanzen der Fall war.

3. Die Abhängigkeit der Wirkung von der Dissoziation der Fusarinsäure

Wie schon eingangs erwähnt, stellten GÄUMANN und Mitarbeiter an Hand von Welkeversuchen an abgeschnittenen Tomatensprossen fest, daß die Wasserstoffionenkonzentration der verabreichten Toxinlösung auf den Welkeerfolg einen entscheidenden Einfluß ausübt. Bei Verwendung von Tomatenpflanzen verschiebt sich der Wirkungsort von einer hauptsächlich Schädigung der Stengelgewebe bei tiefem pH und geringer Dissoziation zu einer vorwiegenden Blattschädigung bei hohem pH und hoher Dissoziation. Die Autoren ziehen den Schluß, daß das undissoziierte Molekül leichter in die Zellen einzudringen vermag und während der kurzen Zeitspanne der Toxinaufnahme schon im Leitbündel angreifen kann, während die dissoziierte Säure erst in den Blättern zur Wirkung kommt, wo sie angereichert und in

undissoziiertem Zustand ins Zellinnere eindringen würde. So erwähnen auch FLOREY, CHAIN et al., daß verschiedene Antibiotica wie Streptothricin, Streptomycin und Proactinomycin in zunehmend alkalischem Milieu toxischer wirken, während saure Toxine, wie Mycophenolsäure, Helvolsäure und Penicillin in zunehmend saurem Milieu erhöhte Toxizität aufweisen. Auch in diesen Fällen besitzt die nicht dissoziierte Form höhere biologische Aktivität als die entsprechenden Ionen.

STOLL, BRACK und RENZ (1952) machen für verschiedene Flechtenstoffe, Farbstoffe aus Mutterkorn usw. dieselbe Feststellung. Ebenso wird die Wirkung von Helixin (LEBEN und KEITT, 1952) und Spergon (KELMAN, 1952) durch das pH des Mediums beeinflusst: die antifungische Wirkung von Helixin wird bei höherem pH, diejenige von Spergon bei tieferem pH wesentlich verstärkt.

Da die Fusarinsäure nach den Resultaten des Welketests und der Versuche über die Atmungshemmung im Blattgewebe als schwache Säure ($pK = 5,81$) ähnlich reagiert, ist anzunehmen, daß die durch Fusarinsäure ausgelöste Gaswechselhemmung der Hefe von der Wasserstoffionenkonzentration in analogem Sinne beeinflusst wird.

a) pH - Abhängigkeit

In einem Kontrollversuch zeigte sich, daß die Fusarinsäure pH-stabil ist, ihre hemmende Wirkung auf den Gaswechsel der Hefe also nach vorausgehender willkürlicher pH-Verschiebung nicht verliert, wie dies auch schon an Hand des Sporenkeimungstests mit *Ustilage zaeae* festgestellt wurde (GÄU-

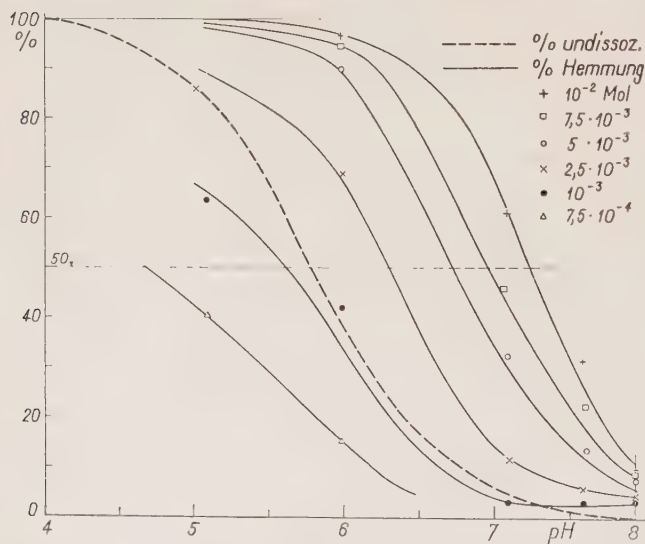


Abb. 3. Die Hemmung der O_2 -Aufnahme der Hefe durch Fusarinsäure verschiedener Konzentrationen bei verschiedenen pH-Werten. Abszisse: pH-Werte der Hefesuspension. Ordinate: Hemmung der O_2 -Aufnahme in % der Kontrollen

MANN, NAEF-ROTH und KOBEL, 1952).

Die sechste Versuchsfrage lautet: Welchen Einfluß übt die Wasserstoffionenkonzentration der Fusarinsäurelösungen auf die Hemmung der Sauerstoffaufnahme der Hefe aus?

Die Abhängigkeit der atmungshemmenden Wirkung der Fusarinsäure von ihrer Dissoziation wurde bei fünf verschiedenen pH-Werten

geprüft und die Hemmung der Sauerstoffaufnahme für die verschiedenen Konzentrationen mit der Dissoziationskurve der Fusarinsäure verglichen.

Versuchsanordnung: Dichte der Hefesuspension 2 ‰; Glukose 1 ‰; Fusarinsäurezusatz 75 Min. vor Meßbeginn; Phosphatpuffer pH 5,0; 6,0; 7,1; 7,5; 7,8. Meßintervall 30. bis 90. Minute nach Meßbeginn.

Die Resultate sind in Abb. 3 graphisch dargestellt und zeigen, daß sich die Folgen der Dissoziation der Säure auf die Glukose-Veratmung der Hefe ähnlich auswirken wie beim Blattgewebe und im Welketest an Tomaten. Der undissoziierten Säure kommt eine erheblich größere Giftwirkung zu als der dissoziierten. Damit stellt sich die Frage nach der Anzahl undissoziierter Moleküle, die notwendig ist, um eine bestimmte Hemmungswirkung auszulösen.

Daher wurde aus den Kurven der Abbildung 3 für die verschiedenen pH-Werte diejenige Konzentration ermittelt, die eine 50 ‰ige Hemmung der Atmungsintensität bewirkt. Die so erhaltenen Werte wurden, entsprechend den pH-Werten der Versuche, denen sie entnommen wurden, mit dem entsprechenden Prozentsatz der undissoziierten Moleküle multipliziert. Die Berechnung erfolgte nach der Formel:

$$\text{pH} = \text{pK} + \log \frac{a}{1-a}$$

Der pK-Wert der Fusarinsäure beträgt nach einer Bestimmung von Herrn W. SIMON (Org. chem. Laboratorium der E.T.H., Zürich) $\text{pK} = 5,81$, so daß sich folgende Werte berechnen lassen (Tabelle 5):

Tabelle 5

Die atmungshemmende Wirkung der Fusarinsäure in Abhängigkeit von der Konzentration der undissoziierten Moleküle

Fusarinsäure Gesamtkonzentrat. Mol. Liter	extrapolierter pH-Wert für die 50 ‰ige Atmungs- hemmung	Konzentration der undissoziiert. Molek. für die 50 ‰ige Atmungshemmung
$7,5 \cdot 10^{-4}$	4,7	$0,70 \cdot 10^{-3}$
10^{-3}	5,7	$0,66 \cdot 10^{-3}$
$2,5 \cdot 10^{-3}$	6,3	$0,60 \cdot 10^{-3}$
$5 \cdot 10^{-3}$	6,7	$0,60 \cdot 10^{-3}$
$7,5 \cdot 10^{-3}$	6,9	$0,69 \cdot 10^{-3}$

Alle Kurven der Abbildung 3 weisen eine gewisse Parallelität mit der Dissoziationskurve auf. Eine 50 ‰ige Hemmung der Hefe-Atmung wird bei steigenden Konzentrationen mit steigendem pH erreicht. Wird die Anzahl der undissoziierten Moleküle in den Lösungen berechnet, die eine 50 ‰ige Hemmung bewirken, so ergibt eine gleiche Konzentration auch dieselbe Hemmungswirkung, unabhängig vom pH-Wert der Suspensionsflüssigkeit und von der Konzentration der verwendeten Toxinlösung.

Aus den Ergebnissen dieser Versuchsreihe kann also abgeleitet werden, daß für die Atmungshemmung der Hefe nur die nicht dissoziierten Fusarinsäure-Moleküle verantwortlich sind. Da die Atmungshemmung von Tomatenblättern in gleicher Weise pH-abhängig ist, liegt der Schluß nahe, daß auch im Blattgewebe nur die nicht dissoziierten Fusarinsäure-Moleküle zur Wirkung kommen. Ebenso geht aus noch unveröffentlichten Versuchen von Frl. E. BACHMANN hervor, daß die durch Fusarinsäure ausgelöste Störung der Wasserpermeabilität von *Spyrogyra* bei $5 \cdot 10^{-3}$ bis 10^{-5} Mol/Liter vom pH-Wert der Toxinlösung abhängt. In diesem Konzentrationsbereich tritt bei pH 4,5 eine ausgeprägte Erhöhung der Wasserpermeabilität ein, die sich mit steigendem pH des Milieus verringert und bei pH 8,5 ganz verschwindet.

Im folgenden wird nun untersucht, wie weit die atmungshemmende, pH-abhängige Wirkung der Fusarinsäure auf Hefe reversibel ist, ob also eine Veränderung der pH-Außenbedingungen die schon eingetretene Hemmung noch zu beeinflussen vermag.

b) pH-Reversibilität

Ist nur das Eindringen des Toxins in die Zelle abhängig von seiner Dissoziation, so ist zu erwarten, daß es, einmal in der Zelle angelangt, seine Wirkung unabhängig vom pH-Wert des Milieus ausübt. Andererseits besteht die Möglichkeit, daß, unabhängig vom Vorgang des Eindringens, die Reaktion selbst mit den am Gaswechsel beteiligten Stoffen pH-abhängig ist. Welkeversuche an ganzen Pflanzen können über diese Frage keinen Aufschluß geben; denn die dort beobachteten Schädigungen sind als makroskopisch erkennbares Endstadium einer groben Dauerschädigung irreversibel. Im Gaswechsel-Versuch mit *Saccharomyces cerevisiae* kann dagegen untersucht werden, ob und wie weit die Atmungshemmung der Hefe durch Fusarinsäure bei einer Veränderung des pH-Wertes der umspülenden Flüssigkeit verstärkt oder aufgehoben wird.

Die siebente Versuchsfrage lautete dementsprechend: Ist die durch Fusarinsäure bedingte Blockierung der Atmung reversibel, und, wenn ja, unter welchen Bedingungen kann sie aufgehoben oder verstärkt werden?

Versuchsanordnung: Hefesuspensionsdichte 2 ‰ in Phosphatpuffer. Temperatur 30 °C, Glukose 1 ‰, zugesetzt 30 Min. vor Meßbeginn, Fusarinsäurekonzentration $2,5 \cdot 10^{-3}$ Mol/Liter, zugesetzt 45 Min. vor Meßbeginn. Das pH der Suspensionsflüssigkeit wurde 60 Min. nach Meßbeginn durch Zusatz einer entsprechenden Menge von HCl oder KOH verändert. Das Versuchsschema gestaltete sich wie folgt (Tabelle 6):

Die Gefäßgruppen A und B liefern Kontrollwerte ohne Zusatz von Fusarinsäure; lediglich die pH-Werte werden während des Versuches verändert. Daß der Hefe-Gaswechsel in weitem Bereich vom pH unabhängig ist, wurde von GEIGER-HUBER (1930) gezeigt.

Tabelle 6
Versuchsschema zu Abb. 4

Gefäß-Gruppe	Bezeichnung der Kurve in Abb. 4	Anfangs-pH-Wert	Zusatz von	nach 60 Min. Zusatz von	Veränderter pH-Wert
A	I	7,7	H ₂ O	HCl	5,0
B	II	5,1	„	KOH	9,9
C	III	7,5	Fusarinsäure	H ₂ O	7,3
D	IV	7,5	„	HCl	4,9
E	V	5,1	„	KOH	9,6
F	VI	5,2	„	H ₂ O	5,1

Aus der graphischen Darstellung des Kurvenverlaufs (Abb. 4) geht hervor, daß

1. die Kontrollkurven (I und II) sich nahezu überdecken; d. h. die Intensität der O₂-Aufnahme bleibt trotz der Verschiebung des pH-Wertes der Suspensionsflüssigkeit während der Versuchszeit unverändert;

2. unter alkalischen Bedingungen die Fusarinsäure in den verwendeten Konzentrationen keine hemmende Wirkung ausübt. Die Kurve III schließt sich den Kontrollkurven an;

3. unter sauren Bedingungen die Fusarinsäure gleicher Konzentration eine starke Hemmung verursacht, Kurve VI;

4. nach einer Verschiebung des pH-Wertes von dem alkalischen nach dem sauren Gebiet (Kurve IV) das Gift sofort zu wirken beginnt, und zwar ist die nun eintretende Hemmung der Atmungsintensität gleich stark wie bei Kurve VI (Parallelität);

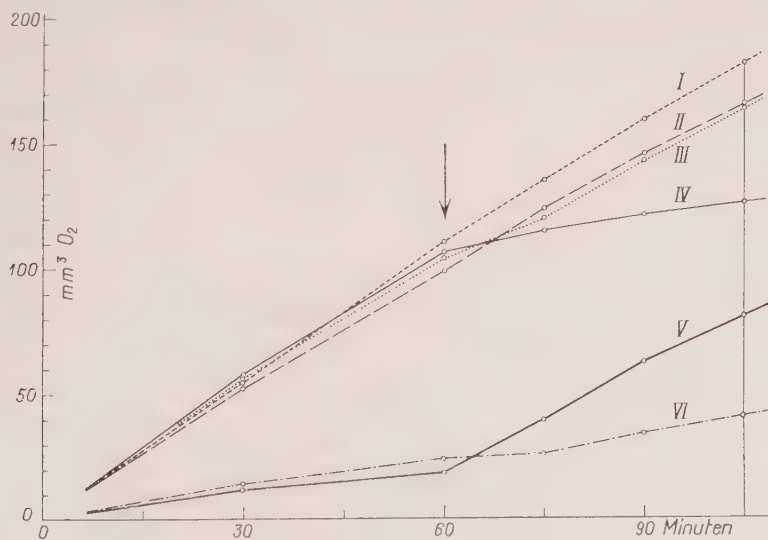


Abb. 4. Die pH-Reversibilität der Hemmung der O₂-Aufnahme bei Hefe durch Fusarinsäure nach einer Einwirkungszeit von zwei Stunden. Abszisse: Einwirkungszeit (Min.). Ordinate: Sauerstoffverbrauch (mm³ O₂)

5. eine Verschiebung des pH-Wertes von sauer nach alkalisch die Hemmung vollkommen aufhebt (Kurve V); die Atmungskurve verläuft nach der Verschiebung des pH-Wertes von 5,1 nach 9,6 parallel zu den Kontrollkurven I, II und III.

Damit ist die Reversibilität der Fusarinsäurewirkung in einem pH-Bereich von 5—9 bewiesen; die Hefe erleidet in der hier untersuchten Einwirkungszeit des Giftes keine Dauerschädigung. Durch den rein physikalisch-chemischen Vorgang einer Verschiebung des pH-Wertes kann die Hemmung der Atmungsintensität vollkommen aufgehoben resp. bei umgekehrter Versuchsanordnung hervorgerufen werden, und zwar in der äußerst kurzen Zeitspanne von 15 Min. nach der pH-Veränderung.

Da die Hefezelle nach einer kurzfristigen Einwirkung durch Fusarinsäure nicht irreversibel geschädigt wird und in diesem Zeitpunkt die Atmungshemmung durch eine pH-Verschiebung noch vollständig aufgehoben werden kann, werden in einer weiteren Versuchsreihe Hefesuspensionen während längerer Zeit der Fusarinsäurewirkung ausgesetzt und dann die Reversibilität der Atmungshemmung durch Veränderung des pH-Wertes untersucht.

Die achte Versuchsfrage heißt demnach: Welchen Einfluß hat eine mehrstündige Einwirkung der Fusarinsäure auf die Hefezelle? Wie weit ist beispielsweise nach 45 Stunden die durch Fusarinsäure bedingte Blockierung der Atmung noch pH-reversibel?

Versuchsanordnung: Hefesuspensionsdichte 2 ‰ in Phosphatpuffer; Temp. 30 °C; Glukose 1 ‰, zugesetzt 30 Min. vor Versuchsbeginn. Fusarinsäurekonzentration $2,5 \cdot 10^{-3}$ Mol/Liter, zugesetzt 1—45 Stunden vor Versuchsbeginn bei pH 7,8 resp. pH 4,5. Der pH-Wert der Suspensions-

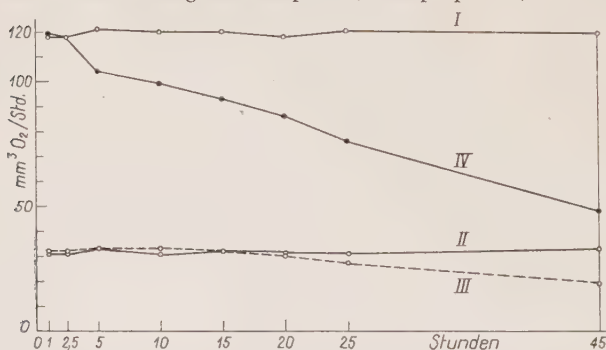


Abb. 5. Die pH-Reversibilität der Hemmung der O_2 -Aufnahme bei Hefe durch Fusarinsäure nach verschieden langer Einwirkungszeit. Abszisse: Einwirkungszeit (Std.). Ordinate: Sauerstoffverbrauch ($mm^3 O_2/Std.$). Kurve I: pH unverändert auf 7,8; Kurve III: pH unverändert auf 4,5; Kurve II: pH bei Versuchsbeginn von 7,8 auf 4,5 verschoben; Kurve IV: pH bei Versuchsbeginn von 4,5 auf 7,8 verschoben

flüssigkeit wurde 30 Min. vor Versuchsbeginn bei der einen Gefäßgruppe von 7,8 auf 4,5 resp. von 4,5 auf 7,8 eingestellt, bei den andern Gefäßgruppen unverändert belassen (Mittelwerte aus drei Parallelen).

Die graphische Darstellung (Abb. 5) zeigt, daß die Atmungsintensität der Hefe bei pH 7,8, auch nach einer langen Einwirkungszeit der Fusarinsäure von 45 Stunden, keine Einbuße er-

leidet; die Kurve I verläuft horizontal. Wird vor Versuchsbeginn der pH-Wert der verschieden lange vergifteten Hefesuspensionen von 7,8 auf 4,5 herabgesetzt, beginnt die undissoziierte Säure sofort zu wirken, und in allen Fällen tritt eine gleich starke Atmungshemmung ein; auch Kurve II verläuft waagrecht.

Die Hefe erfährt durch $2,5 \cdot 10^{-3}$ molare, stark dissoziierte Fusarinsäure bei pH 7,8 auch nach 45 Stunden keine Schädigung; der Sauerstoffverbrauch ist gleich groß wie bei der Kontrolle, und erst nach der pH-Verschiebung von 7,8 auf 4,5 tritt eine Blockierung der Atmung ein, die bei allen Einwirkungszeiten gleiches Ausmaß hat.

Anders liegen die Verhältnisse bei den mit Fusarinsäure gleicher Konzentration bei tieferem pH versetzten Hefesuspensionen. Bei Einwirkungszeiten von 1–20 Stunden wird die Sauerstoffaufnahme von 120 mm³/Std. auf 30–33 mm³/Std. gedrosselt; Kurve III verläuft bis dahin waagrecht, beginnt aber dann abzusinken. Nach 45 Stunden beträgt der Sauerstoffverbrauch nur noch 19 mm³/Std. Die Hefe erleidet durch undissoziierte Fusarinsäure mit zunehmender, Einwirkungszeit eine zunehmende irreversible Schädigung, die nach 45 Stunden die Atmungsintensität auf nur 19 mm³/Std. herabzusetzen vermag.

Wird nun der pH-Wert dieser mit undissoziierter Fusarinsäure (pH 4,5) versetzten Hefesuspensionen vor Versuchsbeginn auf pH 7,8 eingestellt und jetzt die Atmungsintensität geprüft, so zeigt die Kurve IV, daß sowohl nach 1 wie nach 2,5 Stunden die Blockierung der Atmung noch zu 100% aufgehoben werden kann. (Die Kurve IV deckt sich anfänglich mit Kurve I, Sauerstoffverbrauch 120 mm³/Std.); doch beginnen die Werte der Kurve IV schon nach fünf Stunden langsam zu sinken, bis nur noch ein Sauerstoffverbrauch von 48 mm³/Std. festzustellen ist. Nach 45 stündiger Einwirkungszeit der undissoziierten Säure kann durch eine pH-Verschiebung die Blockierung der Sauerstoffaufnahme nur noch zu 18% aufgehoben werden. Der Vorgang ist also nur noch zu einem kleinen Teile pH-reversibel; die Hefe wird durch nicht dissoziierte Fusarinsäure nach 2,5 Stunden nicht meßbar, nach 45 Stunden jedoch sehr stark irreversibel geschädigt.

Tabelle 7

Anzahl toter Hefezellen in 2%iger Suspension bei pH 4,5 und 7,8 nach verschiedenen langer Einwirkungszeit von Fusarinsäure ($2,5 \cdot 10^{-3}$ Mol/Liter)

Einwirkungszeit der Fusarinsäure Std.	% toter Zellen	
	pH 4,5	pH 7,8
0	3	3
1	3	3
2,5	3	4
5	5	3
10	8	3
15	15	4
20	22	3
25	29	4
45	35	4

Wird durch Färbung mit Methylenblau (REUSSER, 1952) in den untersuchten Hefesuspensionen die Anzahl der toten Zellen bestimmt, so ergibt sich trotz der relativen Ungenauigkeit der Methode eine gute Parallele zu den Ergebnissen der Abbildung 5 in Tabelle 7.

Der Prozentsatz gefärbter (also toter) Zellen ist nach Einwirkung stark dissoziierter Fusarinsäure auch nach 45 Stunden noch ungefähr gleich hoch wie bei der Kontrolle, während nach Einwirkung der praktisch undissoziierten Säure die Anzahl der abgetöteten Zellen mit zunehmender Einwirkungszeit ansteigt.

Diese Erscheinungen können auf verschiedene Weise erklärt werden:

1. Die Aufnahme der Fusarinsäure durch die Zelle ist pH-abhängig. Im alkalischen Medium wird weniger Toxin aufgenommen; erst die Verschiebung nach der sauren pH-Seite ermöglicht den undissoziierten Säuremolekülen das Eindringen in die Hefezelle. Das nächste Kapitel gibt eine Bestätigung in diesem Sinne. Bei dieser Annahme müßte man sich, um die Reversibilität zu erklären, vorstellen, daß die beim tiefen pH in die Zellen eingedrungenen, undissoziierten Fusarinsäuremoleküle am Wirkungsort verändert werden, so daß sie ihre Giftigkeit verlieren. Die pH-Veränderung würde nur noch den Nachschub der undissoziierten Moleküle unterbinden. Denn bei der Verschiebung des pH-Wertes nach der alkalischen Seite tritt in kurzer Zeit eine Aufhebung der Hemmungswirkung ein. Eine Decarboxylierung im Sinne von SANWAL konnte nach der Interpretation der vorangehenden Versuche unter diesen Versuchsbedingungen nicht festgestellt werden. (Die dort beobachtete Steigerung der CO_2 -Abgabe ist auf den Pasteur-Effekt zurückzuführen.) Doch bleibt die Möglichkeit bestehen, daß die Fusarinsäure in der Hefezelle auf andere Art und Weise deaktiviert wird.
2. Die Blockierungsreaktion des Gaswechselsystems durch die Fusarinsäure selbst ist pH-empfindlich, so daß (durch die Verschiebung von sauer nach alkalisch) die Hemmung der O_2 -Aufnahme vermindert resp. (bei einer Verschiebung von alkalisch nach sauer) verstärkt wird. Das fünfte Kapitel, das über Versuche mit lyophilisierter Hefe berichtet, soll nähere Anhaltspunkte darüber geben, wie weit die Reaktionen an und für sich nach Zerstörung der Semipermeabilität der Plasmamembran pH-empfindlich sind.

4. Die Aufnahme der Fusarinsäure durch die Hefezellen

Um die durch die Hefezelle aufgenommene Fusarinsäuremenge zu erfassen, wurde der Fusarinsäureschwund aus der die Zellen umspülenden Lösung bei verschiedenen pH-Werten in folgender Versuchsanordnung bestimmt:

Einer 20 %igen Hefesuspension in Phosphatpuffer der pH-Werte 4,5, 6,0 und 7,8 wird unter Berücksichtigung des Hefevolumens (REUSSER, 1952)

Fusarinsäure zugesetzt, so daß die Endkonzentration $5 \cdot 10^{-3}$ Mol/Liter beträgt. Die Suspensionen werden zwei Stunden bei 30°C geschüttelt; dann wird die Hefe abzentrifugiert und die überstehende Lösung auf ihren Gehalt an Fusarinsäure geprüft.

Die quantitative Bestimmung der Fusarinsäure erfolgte an Hand von Sporenkeimungstesten mit Brandsporen von *Ustilago zae* (KOBEL, 1951), deren Empfindlichkeit für das Toxin schon eingangs erwähnt wurde. Als Kontrolle wurde eine $5 \cdot 10^{-3}$ molare Fusarinsäurelösung mitgetestet.

In Tabelle 8 sind die Ergebnisse (gemittelt aus fünf Parallelversuchen) zusammengestellt und zeigen, daß

Tabelle 8

Die pH-Abhängigkeit der Aufnahme von Fusarinsäure durch die Hefezelle

pH der Suspensionsflüssigkeit	eingedrungene oder anhaftende Fusarinsäure in % der Kontrolle
4,5	$45,4 \pm 7,8$
6,0	$33,7 \pm 9,9$
7,8	$12,0 \pm 6,6$

1. die in die Zellen eingedrungene oder ihnen anhaftende Toxinmenge von den Dissoziationsverhältnissen abhängt;
2. auch bei einem pH-Wert von 7,8 noch 12 % Fusarinsäure durch die Hefezellen absorbiert werden, obschon bei diesem pH-Wert keine Ver-ringerung der Atmung mehr festgestellt werden kann.

Um auch den zeitlichen Verlauf des Aufnahme-Vorganges zu verfolgen und zudem die Resultate der vorangegangenen Versuchsreihe zu sichern, wurden in einer nächsten Versuchsreihe die Proben zeitlich gestaffelt entnommen und der Fusarinsäuregehalt der Außenlösungen durch die Bestimmung der Extinktion im UV-Spektrographen nach Beckmann ermittelt (ZÄHNER, 1954).

Tabelle 9

Die pH-Abhängigkeit der Aufnahme von Fusarinsäure durch die Hefezelle nach verschiedenen Einwirkungszeiten

Einwirkungszeit Min.	eingedrungene oder anhaftende Fusarinsäure in % der Kontrolle bei einem pH-Wert von		
	4,5	6,0	7,8
30	49	41	15,5
60	55	41	15,5
90	51	37	19,5
120	53	41	19,5

Auch Tabelle 9 bestätigt, daß bei geringer Dissoziation prozentual mehr Fusarinsäure aus der Lösung verschwindet als bei starker Dissoziation. Die Fusarinsäure dringt sehr rasch in die Hefezellen ein; denn schon nach 30 Min. wird praktisch kein Toxin mehr aus der Lösung aufgenommen.

Die Tatsache, daß auch bei einem pH-Wert von 7,8, bei welchem die Gaswechselhemmung ausbleibt, der Fusarinsäuregehalt der abzentrifugierten Lösung nur um 12—20 % zurückgeht, dürfte dadurch zu erklären sein, daß

dieser Anteil der Fusarinsäure den Zellen oberflächlich anhaftet, da für diese Versuche eine sehr dichte Hefesuspension von 20 % verwendet wurde.

5. Der Einfluß der Fusarinsäure auf lyophilisierte Hefe

Aus den Resultaten des dritten Kapitels geht hervor, daß die Wirkung der Fusarinsäure auf den Gaswechsel der Hefe von ihrem Dissoziationsgrad abhängig ist, indem das Ausmaß der Atmungshemmung (wie auch der Gärungshemmung, Abb. 2) mit den Konzentrationen an nicht dissoziierten Molekülen in Zusammenhang steht.

Im vorangehenden vierten Kapitel zeigt auch die Aufnahme der Fusarinsäure durch die Hefezellen eine ausgesprochene Abhängigkeit vom Dissoziationsgrad des Toxins: bei einem pH-Wert von 4,5 verschwinden etwa 50 %, bei einem pH-Wert von 7,8 jedoch nur 12—20 % der Fusarinsäure aus der umspülenden Flüssigkeit.

Das vorliegende fünfte Kapitel umfaßt einige orientierende Versuche über die Verhältnisse bei Hefelyophilisat, d. h. bei Hefe, deren Plasmamembran zerstört ist, während ihre fermentative Wirksamkeit erhalten bleibt. Unter diesen Versuchsbedingungen sollte der Vorgang der selektiven Aufnahme durch die Plasmamembran ausgeschaltet und nur die Wirkung der Fusarinsäure auf die Oxydations- und Fermentationsreaktionen geprüft werden können.

So heißt die neunte Versuchsfrage: Werden Sauerstoffaufnahme und Kohlensäureabgabe bei lyophilisierter Hefe durch Fusarinsäure beeinflusst, und, wenn ja, ist die Wirkung der Fusarinsäure abhängig von der Wasserstoffionenkonzentration?

Versuchsanordnung: Die Hefezellen wurden durch Lyophilisieren abgetötet, wobei 98 % der Zellen sich mit Methylenblau färben; nur 1 % bleibt lebensfähig. Eine Suspension in Phosphatpuffer von 2 % dieser abgetöteten Hefe gelangte in die Manometergefäße, die eine Gruppe bei pH 7,8, die andere bei pH 4,5. Versuchstemp. 30 ° C; Glukose 1 %; Fusarinsäure $2 \cdot 10^{-2}$ Mol/Liter.

Tabelle 10

Der Einfluß von Fusarinsäure bei pH 7,8 und 4,5 auf Suspensionen von normaler und lyophilisierter Hefe (Mittel aus acht Parallelen)

Zusatz von Fusarinsäure	Hemmung in % der Kontrolle			
	pH 7,8		pH 4,5	
	O ₂	CO ₂	O ₂	CO ₂
normale Hefe	12	23	94	95
lyophilisierte Hefe	59	82	89	98

Die fermentative Aktivität der lyophilisierten Hefe bleibt nur bis zu einem gewissen Grade erhalten; sie ist zehnmal geringer als bei normaler

Hefe, weshalb die Suspensionsdichte auf 2 % erhöht werden mußte. Auch wurde zu diesem Vergleichsversuch eine relativ hohe Fusarinsäurekonzentration gewählt, um sichere Unterschiede zu erhalten.

Wie aus den Werten der Tabelle 10 zu ersehen ist, wird bei diesen Toxinkonzentrationen die Sauerstoffaufnahme und die Kohlendioxydabgabe der normalen Hefe bei pH 4,5 nahezu total (O_2 94 %; CO_2 95 %), bei pH 7,8 nur wenig (O_2 12 %; CO_2 23 %) gehemmt. Dagegen liegen die Werte der abgetöteten Hefe bei pH 4,5 etwas tiefer (O_2 89 %; CO_2 98 %) und bei pH 7,8 wesentlich höher (O_2 59 %; CO_2 82 %). Die Oxydationsvorgänge im Lyophilisat sind zwar auch pH-abhängig, jedoch viel weniger ausgeprägt als bei der lebenden Hefe: die Differenz erniedrigt sich von 82 % auf 30 %. Vergleicht man die entsprechenden Zahlen für die Kohlendioxydabgabe, so ist der Unterschied noch ausgesprochener: bei der lebenden Hefe ist die Differenz zwischen den beiden pH-Werten 72 % und reduziert sich im Lyophilisat auf nur 16 %.

Die Blockierung des Gaswechselsystems unter Ausschaltung der Semi-permeabilität der Plasmagrenzschicht ist also nur zu einem kleinen Teile pH-empfindlich; denn die Fermentsysteme des Hefelyophilisats werden auch durch die stark dissoziierte Fusarinsäure (pH 7,8) zu 60—90 % blockiert.

In der zehnten Versuchsreihe wird die pH-Reversibilität der Blockierung der Oxydationsvorgänge durch Fusarinsäure geprüft, und die entsprechende Versuchsfrage lautet demnach: Wie weit kann die Blockierung des O_2 -Verbrauches eines Hefelyophilisates durch nicht dissoziierte Fusarinsäure nach einer pH-Verschiebung auf 7,8 aufgehoben werden, und umgekehrt, verstärkt sich die Hemmung der O_2 -Aufnahme durch dissoziierte Fusarinsäure nach einer pH-Verschiebung auf 4,5?

Versuchsanordnung: Lyophilisierte Hefe wurde unter Zugabe von 1 % Glukose und $2 \cdot 10^{-2}$ molarer Fusarinsäure in Phosphatpuffer von pH 4,5 und 7,8 suspendiert. Versuchstemperatur 30 °C. Nach zwei Stunden wurden die pH-Werte je bei der einen Hälfte der Gefäße, inklusive Kontrollen, von 4,5 auf 7,8 resp. von 7,8 auf 4,5 verschoben.

Die Resultate sind in Tabelle 11 aufgeführt und zeigen, daß in dieser Versuchszeit der pH-abhängige Anteil der Blockierung der Sauerstoffaufnahme wiederum pH-reversibel ist. Durch die Verschiebung von pH 4,5 auf 7,8 sinkt die prozentuale Hemmung von 78 auf 51 %; bei umgekehrter Versuchsanordnung (pH 7,8 \rightarrow pH 4,5) steigt die prozentuale Hemmung von 47,5 auf 75 %.

Zusammenfassend stellen wir fest, daß die Fusarinsäure auf verschiedene Art und Weise in die Lebensvorgänge der Hefezellen eingreift. Der größte Teil ihrer Hemmungswirkung ist von ihrem Dissoziationsgrad unabhängig, insofern sie bei günstigem pH (sauer) eindringen konnte, und dürfte auf Chelatbindungen mit den zur Verfügung stehenden Schwermetallionen des

Tabelle 11

Die pH-Reversibilität der Hemmung der O₂-Aufnahme durch Fusarinsäure bei lyophilisierter Hefe

Hemmung der O ₂ -Aufnahme in % der Kontrollen			
Anfangs-pH		pH verschoben von	
4,5	7,8	4,5 → 7,8	7,8 → 4,5
78	47,5	51	75

Plasmas beruhen, die dadurch den Enzymsystemen entzogen werden. Der restliche Anteil der Reaktion ist hingegen pH-abhängig und auch pH-reversibel, kann also bei Hefe bei kurzen Einwirkungszeiten durch den pH-Wert des Milieus gesteuert werden.

Es bleibt weiteren Arbeiten überlassen, zu untersuchen, welche Enzymsysteme der pflanzlichen Zelle durch Fusarinsäure blockiert werden, ob und welche Chelatbindungen für die Blockierung verantwortlich gemacht werden können und welche andersgearteten Wirkungen der Fusarinsäure zuzuschreiben sind. Ferner bleibt zu klären, welches Schicksal das Toxin in der Pflanze erleidet und in welcher Art es möglicherweise durch die Pflanze verändert wird.

Zusammenfassung und Schlußfolgerungen

Auf Grund dieser Untersuchungen kann folgendes festgehalten werden:

1. Durch Fusarinsäure wird die *G l u k o s e - V e r a t m u n g* der Hefe gehemmt, und zwar ist das Ausmaß der Hemmung sowohl von der Konzentration wie von der Dissoziation des Toxins abhängig. Eine 50 %ige Hemmung der Sauerstoffaufnahme wird bei pH 6,2 durch eine Konzentration von $4 \cdot 10^{-3}$ Mol/Liter, bei pH 4,5 jedoch durch die wesentlich niedrigere Konzentration von 10^{-3} Mol/Liter ausgelöst. Bei beiden pH-Werten bewirkt jedoch eine gleich hohe Konzentration an undissoziierten Toxinmolekülen von $0,7 \cdot 10^{-3}$ Mol/Liter die gleiche prozentuale Hemmung.

2. Auch die *e n d o g e n e A t m u n g* der Hefe wird durch Fusarinsäure gehemmt, jedoch in wesentlich geringerem Ausmaß als die Glukose-Veratmung; denn die 50 %ige Hemmung der Sauerstoffaufnahme wird, bei pH 4,5, durch eine Konzentration von $7,5 \cdot 10^{-3}$ Mol/Liter hervorgerufen. Die Wirkung der Fusarinsäure auf die Eigenatmung ist also rund zehnmal geringer als auf die Glukose-Veratmung.

3. Die *G l u k o s e - V e r g ä r u n g* wird unter anaeroben und aeroben Bedingungen beeinflusst. Unter Sauerstoffausschluß ist die Hemmung der CO₂-Produktion konzentrationsabhängig. Die 50 %ige Hemmung der CO₂-Abgabe wird durch eine Fusarinsäurekonzentration von 10^{-3} Mol/Liter erreicht. Die aerobe Glukose-Vergärung zeigt dagegen bei niederen Toxin-konzentrationen eine gesicherte Steigerung der CO₂-Produktion. Der Atmungsquotient verschiebt sich und erreicht bei beiden untersuchten pH-Werten sein Maximum bei einer Konzentration an nicht dissoziierten Toxin-

molekülen von $7,2$ bis $7,3 \cdot 10^{-4}$ Mol/Liter. — Bei hohen Giftkonzentrationen ist die aerobe Gärung ebenfalls abhängig von Konzentration und Dissoziationsgrad, und zwar wird eine 50%ige Hemmung wie bei der Atmungshemmung unabhängig von der Gesamtkonzentration und vom pH des Milieus durch eine Konzentration an nicht dissoziierten Molekülen von $1,5$ bis $1,7 \cdot 10^{-3}$ Mol/Liter erreicht.

Sowohl Sauerstoffaufnahme wie Kohlensäureabgabe werden also nur durch die nicht dissoziierten Fusarinsäuremoleküle beeinflusst.

4. Die Schädigung der Hefezelle durch nicht dissoziierte Fusarinsäure ist (in den ersten zwei bis drei Stunden der Einwirkung) reversibel. Denn durch Veränderung des pH-Wertes des Milieus von $5,1$ auf $9,6$ kann die starke Hemmungswirkung auf die Atmung sofort total aufgehoben werden. Dagegen sterben die Hefezellen mit zunehmender Einwirkungszeit der nicht dissoziierten Säure in zunehmendem Maße ab, so daß nach 45 Stunden der Vorgang nur noch zu 18 % reversibel ist. Stark dissoziierte Fusarinsäure vermag die Hefezelle auch nach 45 stündiger Einwirkung nicht zu schädigen.

5. Das Eindringen der Fusarinsäure in die Hefezelle ist abhängig von der Dissoziation der Säure, indem bei pH $4,5$ rund viermal mehr Toxin von der Hefe aufgenommen wird als bei pH $7,8$.

6. Die gaswechselhemmende Wirkung der Fusarinsäure kann auch an lyophilisierter Hefe beobachtet werden. Doch ist sie nach Ausschluß der selektiven Aufnahme der Plasmamembran (durch Behandlung in der Kälte) nur noch zu einem kleinen Teile pH-abhängig. Die Fusarinsäure dringt nur als nicht dissoziiertes Molekül in die Zelle ein; doch einmal in der Zelle angelangt, vermag sie ihre plasmaschädigende Wirkung zum größten Teile unabhängig vom pH des Milieus auszuüben. Die Tatsache, daß in den ersten Stunden die der Fusarinsäure ausgesetzte Hefe nicht vital geschädigt wird, und daß die Hemmungswirkung durch den rein physikalisch-chemischen Vorgang einer pH-Verschiebung zu 100 % und in sehr kurzer Zeit aufgehoben werden kann, läßt eine Veränderung der Fusarinsäure in der pflanzlichen Zelle vermuten. Eine Decarboxylierung im Sinne SANWALS (1955) läßt sich bei Hefe nicht nachweisen; doch könnte man sich auch andere Möglichkeiten eines Aktivitätsverlustes vorstellen.

Wenn wir versuchen, diese Tatsachen auf das Krankheitsgeschehen in der Tomatenpflanze zu übertragen, können wir folgendes feststellen:

Nach neuesten noch nicht veröffentlichten Untersuchungen in unserem Institut und nach der Publikation von LAKSHMINARAYANAN und SUBRAMANIAN (1955) kann Fusarinsäure in durch *F. lycopersici* Sacc. infizierten Tomaten und in durch *F. vasinfectum* Atk. infizierten Baumwollpflanzen nachgewiesen werden. Sie wird also auch in vivo gebildet und ist bei beiden Welkekrankheiten mit verantwortlich für die visuell erkennbaren Symptome, hauptsächlich für die in den Blattspreiten auftretenden nekrogenen Schädigungen, die auch durch das reine Toxin in vitro an unseren Testpflanzen

ausgelöst werden. Die pH-abhängige Wirkung auf Tomatenpflanzen läßt sich durch das je nach dem Dissoziationszustand des Moleküls verschiedene Eindringungsvermögen in die pflanzliche Zelle erklären. So kommen bei Vergiftung mit undissoziierter Fusarinsäure die ausgesprochenen Stengelläsionen zustande, während die Blattnekrosen eher zurücktreten und sich erst bei Vergiftung mit stark dissoziierter Fusarinsäure voll ausprägen. Im ersten Falle vermögen die undissoziierten Moleküle schon während der Aufnahme in die den Leitungsbahnen anliegenden Zellverbände einzudringen, und nur ein geringer Anteil der konstant gehaltenen Giftdosis gelangt bis in die Blätter hinauf. Im letzten Falle treten auf dem Wanderungswege bis ins Blattwerk keine oder nur geringe Materialverluste ein, und die volle Dosis kommt erst dort zur Wirkung, wenn auch in großer Verdünnung. Stellt man sich vor, daß das Toxin in gewissen Bezirken der Blattspreiten angereichert wird und in nicht dissoziiertem Zustand in die Zellen einzudringen vermag, kann so die stärkere Wirkung auf das Blattwerk erklärt werden, wenn berücksichtigt wird, daß bei Erhöhung der Konzentration der Anteil an undissoziierten Molekülen zunimmt. Der Widerspruch zu den Versuchen an Hefe ist nur scheinbar. Einmal in die Zelle eingedrungen, blockiert die Fusarinsäure gewisse Enzymsysteme, z. B. diejenigen der Atmung, teilweise abhängig, teilweise unabhängig von ihrer Dissoziation, und vermag so das pflanzliche Plasma zum Absterben zu bringen.

Summary

1. The utilisation of glucose by yeast is inhibited by fusaric acid, the degree of inhibition being dependent on the concentration as well as on the dissociation of the toxin. At pH 6.2 a 50 per cent inhibition of the oxygen uptake is caused by a concentration of $4 \cdot 10^{-3}$ mol/liter; at pH 4.5, however, the concentration required is only 10^{-3} mol/liter. With both pH values the same concentration of undissociated toxin molecules ($0.7 \cdot 10^{-3}$ mol/liter) effects the same procentual inhibition.

2. The endogenous respiration of yeast is also inhibited by fusaric acid, but to a considerably lower degree than the utilisation of glucose; the 50 per cent inhibition of the oxygen uptake is caused by a concentration of $7.5 \cdot 10^{-3}$ mol/liter. The effect of fusaric acid on the endogenous respiration is therefore approximately ten times smaller than the effect on the utilisation of glucose.

3. The fermentation of glucose is influenced in aerobic and anaerobic conditions. With oxygen being eliminated the inhibition of the CO_2 production depends on the concentration. A 50 per cent inhibition of the CO_2 production is effected by a concentration of fusaric acid of 10^{-3} mol/liter. For the aerobic fermentation of glucose with low concentration of toxin an increase of the CO_2 production is ascertained. The respiratory quotient is altered and reaches its

maximum for both pH values (4.5 and 6.2) in a concentration on undissociated molecules of 7.2 to $7.3 \cdot 10^{-4}$ mol/liter. With high concentrations of toxin the aerobic fermentation also depends on the concentration and the degree of dissociation. A 50 per cent inhibition is effected by a concentration on undissociated molecules of 1.5 to $1.7 \cdot 10^{-3}$ mol/liter independent of the total concentration and the pH of the solutions, the same as with the inhibition of the respiration. Thus the oxygen uptake and the production of CO_2 are only influenced by the undissociated molecules of fusaric acid.

4. The impairment of the yeast cell by undissociated fusaric acid is reversible in the first two or three hours of operation. By an alteration of the pH value of the solutions from 5.1 to 9.6 the strong inhibitive effect on the respiration can at once be completely eliminated.

On the other hand, the yeast cells die away in an increasing degree the longer the undissociated acid operates, so that after 45 hours the process is reversible only up to 18 per cent. Heavily dissociated fusaric acid cannot impair the yeast cell after 45 hours of operation.

5. The penetration of fusaric acid into the yeast cell depends on the dissociation of the acid. The quantity of toxin resorbed by the yeast at pH 4.5 is four times the quantity resorbed at pH 7.8.

6. The inhibitive effect of fusaric acid on the metabolism can be observed on 'permeabilized' yeast too (p. 290). After the elimination of the selective resorption by the plasma membrane (through chilling) this effect depends only in a small degree on the pH values of the solutions. Therefore, only penetration into the cell depends on the dissociation of the toxin molecules; once in the cell, fusaric acid can injure the plasma almost independent of the pH of the surroundings. The fact that in the first hours of exposure to fusaric acid the yeast is not vitally injured and that the inhibitive effect can be completely offset by the purely physico-chemical process of a pH alteration and in a very short time, makes it appear probable that the fusaric acid undergoes a change in the plant cell. However, a decarboxylation of the acid cannot be proved in yeast. But there are other conceivable possibilities of a loss of activity.

Literaturverzeichnis

- DEUEL, H., 1954: Über Störungen des Spurenelementhaushaltes der Pflanzen durch Welketoxine. *Phytopath. Z.* 21, 337—348.
- DIXON, M., 1943: *Manometric Methods*. Cambridge (University Press).
- FLOREY, H. W., CHAIN, E. et al., 1949: *Antibiotics*. London, New York, Toronto (Oxford University Press).
- GÄUMANN, E., NAEF-ROTH, St. und KOBEL, H., 1952: Über Fusarinsäure, ein zweites Welketoxin des *Fusarium lycopersici* Sacc. *Phytopath. Z.* 20, 1—38.
- , REUSSER, P. und AMMANN, A., 1952: Über den Einfluß einiger Welketoxine und Antibiotica auf die osmotischen Eigenschaften pflanzlicher Zellen. *l. c.* 19, 160—220.

- GEIGER-HUBER, M., 1930: Über die Beeinflussung der Hefeatmung durch Neutralrot. Proc. Kon. Acad. V. Wetensch. 33, 1059.
- GROSSER, A. und FRIEDRICH, W., 1947: Eine Testmethode zur Bestimmung von Pilzhemmstoffen. Z. f. Naturforschung, 2 b, 11/12, 425—427.
- KELMAN, A., 1947: The effect of hydrogen-ion concentration on the toxicity of Spergon. Phytopathology 37, 12.
- KOBEL, F., 1951: Untersuchungen über toxische Stoffwechselprodukte von *Nectria cinnabarina* (Tode) Fr. Phytopath. Z. 18, 157—195.
- LAKSHMINARAYANAN, K. und SUBRAMANIAN, D., 1955: Is Fusaric acid a vivotoxin? Nature 176, 697—698.
- LEBEN, C. und KEITT, G. W., 1952: Studies on Helixin in relation to plant disease control. Phytopathology 42, 168—170.
- LINDER, A., 1951: Statistische Methoden für Naturwissenschaftler, Mediziner und Ingenieure. 2. Aufl. Birkhäuser, Basel, 238 S.
- NAEF-ROTH, St. und REUSSER, P., 1954: Über die Wirkung der Fusarinsäure auf den Gaswechsel von Tomatenblattgewebe. Phytopath. Z. 22, 281—287.
- PLATTNER, Pl. A., KELLER, W. und BOLLER, A., 1954: Konstitution und Synthese der Fusarinsäure. Helv. Chim. 37, 5.
- REUSSER, P., 1952: Über den Einfluß von Patulin auf den Gaswechsel der Hefezellen. Phytopath. Z. 19, 221—265.
- RIEDER, H. P., 1951: Über die Zuckeraufnahme von Hefezellen. Ber. Schweiz. Bot. Ges. 61, 539—622.
- SANWAL, B. D., 1956: Investigations on the metabolism of *Fusarium lycopersici* Sacc. with the aid of radioactive carbon. Phytopath. Z. 25, 333—384.
- STOLL, A., BRACK, A. und RENZ, J., 1952: Die pH-Abhängigkeit der Wirkung einiger Antibiotika im Plattentest. Schweiz. Z. f. Path. u. Bakt. 15, 591—597.
- TAMARI, K. und KAJI, J., 1952: Studies on the mechanism of injurious action of Fusarinic acid on plant growth. J. Agr. Chem. Soc. Japan 26, 223—227, 295—298, 298—303, 345—349, 349—353.
- — and — —, 1951: Studies on the mechanism of injurious action of Fusarinic acid on plant growth. J. Agr. Chem. Soc. Japan 27, 144—147, 147—150, 159—161, 245—249, 249—252, 302—306.
- UMBREIT, W. W., BURRIS, R. H. and STAUFFER, J. F., 1949: Manometric techniques and tissue metabolism. Minneapolis (Burgess publishing Co.).
- WARBURG, O., 1926: Über den Stoffwechsel der Tumoren. Springer, Berlin.
- YABUTA, T., KAMBE, K. and HAYASHI, T., 1934: Biochemistry of the Bakanaefungus. J. Agr. Chem. Soc. Japan 10, 1059—1068, zit. nach Chemical Abstracts 29, 1132, 1938.
- ZÄHNER, H., 1954: Die Bestimmung der Fusarinsäure mit Hilfe der Papierchromatographie. Phytopath. Z. 22, 227—228.

*Aus dem Botanischen Institut der Techn. Hochschule Braunschweig und dem
Institut für Mikrobiologie der Universität Greifswald*

Untersuchungen über die von *Pseudomonas phaseolicola* (Burkh.) hervorgerufene Fettfleckenkrankheit der Bohne

II. Untersuchungen zur Pathogenese

Von

L. WAITZ und W. SCHWARTZ

Mit 6 Abbildungen

I. Einleitung

In unserer ersten Mitteilung über die Fettfleckenkrankheit der Bohne (WAITZ, GÄSSNER und SCHWARTZ, 1956) haben wir über Methoden zur Infektion von Versuchspflanzen berichtet.

Überblickt man, was bisher über die Fettfleckenkrankheit veröffentlicht worden ist¹⁾, so fällt auf, daß über die Ausbreitung des Erregers in der infizierten Pflanze verhältnismäßig wenig bekannt ist. Vor allem bedarf das Zustandekommen des Mosaik-Symptoms in Verbindung mit der Frage nach der Anwesenheit des Erregers und nach dem Vorkommen von Toxinen eingehender Untersuchungen.

Die Methoden der Aufzucht von Versuchspflanzen, der Isolierung und Züchtung des Erregers und der Infektion waren die gleichen wie früher¹⁾.

II. Verhalten des Erregers nach der Infektion

1. Lokalisation und Wanderung des Erregers in der Pflanze

Wir haben untersucht, ob und innerhalb welcher Zeit der Erreger von der Injektionsstelle im Primärblatt aus die Hauptleitbündel in der Sproßachse erreicht, und ob er sich in ihnen ausbreitet.

¹⁾ Vgl. unsere erste Mitteilung.

Von Pflanzen, deren Internodium zwischen dem Knoten des Primärblattes und des ersten Folgeblattes noch nicht gestreckt war, wurden beide Primärblätter injiziert. Nach verschiedenen Zeitintervallen haben wir die infizierten Primärblätter einschließlich ihres Blattstieles entfernt.

Tabelle 1

Verhalten der Pflanzen nach Entfernung des primären Infektionsherdes

(Versuche mit je zehn Pflanzen, bei der Kontrolle blieb das injizierte Primärblatt an der Pflanze. Ablesung nach vier Wochen)

Infizierte Primärblätter entfernt nach	Zahl der Pflanzen			
	Gesunde Pflanzen	Erstes Folgeblatt mit Mosaik	Erstes Folgeblatt grün, zweites mit Mosaik	Fuß- krankheiten durch andere Erreger
6 Std.	8	—	1	1
12 „	8	—	2	—
24 „	6	1	2	1
48 „	5	3	2	—
3 Tagen	3	4	3	—
4 „	—	8	2	—
5 „	1	8	—	1
6 „	—	10	—	—
Kontrolle	—	9	—	1

Der Prozentsatz der an Mosaik erkrankten Pflanzen war um so höher, je länger der primäre Bakterienherd an den Pflanzen belassen wurde (Tabelle 1). Während bei Pflanzen, denen nach sechs und zwölf Stunden die infizierten Primärblätter abgenommen worden waren, nur vereinzelt schwache Mosaiksymptome auftraten, hatte die Hälfte der Pflanzen, die während zweier Tagen mit dem primären Infektionsherd in Verbindung geblieben waren, durch Mosaik verfärbte Blätter. Bei Entfernung der Primärblätter nach vier bis sechs Tagen blieb nur noch eine Pflanze gesund. Im Kontrollversuch erkrankten sämtliche Pflanzen (bis auf eine) mit Mosaiksymptomen. Es nahm nicht nur der Prozentsatz an erkrankten Pflanzen zu, sondern gleichzeitig ging der Prozentsatz an Pflanzen mit schwach und spät auftretenden Mosaiksymptomen zurück.

Es geht aus diesen Versuchen zwar hervor, daß vom primären Infektionsherd aus schon innerhalb weniger Stunden eine Generalisierung der Krankheit einsetzt, aber es bleibt offen, ob die Bakterien selbst oder von ihnen erzeugte Stoffwechselprodukte den Prozeß bewirken. Wir haben daher den soeben beschriebenen Versuch wiederholt und auf das Auftreten von Bakterienzellen in den Geweben geachtet (Tabelle 2).

Die Injektion erfolgte wieder an beiden Primärblättern, die jedoch bei dieser Versuchsserie an der Pflanze verblieben. Es wurden in bestimmten

Zeitintervallen aus dem Blattstielgelenk des injizierten Blattes, aus dem entsprechenden Nodium der Sproßachse, aus dem Internodium 2 bis 3 cm oberhalb dieses Nodiums sowie aus dem Nodium des ersten Folgeblattes steril herauspräpariertes Gefäßbündelgewebe auf Fleischextrakt-Pepton-Agar ausgelegt.

Tabelle 2

Isolierung von *Pseudomonas phaseolicola* aus der Sproßachse nach Injektion der Primärblätter

Versuch mit je zehn Pflanzen. Bedeutung der Zeichen: — negativer, + schwach positiver, ++ stark positiver Erregerbefund (siehe Text). Die Ziffern in der Tabelle bedeuten die Anzahl der Pflanzen in den einzelnen Gruppen. Fett gedruckt sind die Pflanzenzahlen mit positivem Befund

Kulturversuch	Zahl der Pflanzen																	
	Blattstielgelenk Primärblatt			Nodium Primärblatt			Erstes Internodium Mitte			Nodium erstes Folgeblatt			Gelenk erstes Folgeblatt			Mittel- rippe erstes Folgeblatt		
	-	+	++	-	+	++	-	+	++	-	+	++	-	+	++	-	+	++
sofort nach Injektion	10	0	0	10	0	0												
nach 2 Std.	8	2	0	10	0	0												
„ 4 „	7	3	0	9	1	0												
„ 6 „	7	3	0	9	1	0	10	0	0	10	0	0						
„ 12 „	5	5	0	7	3	0	10	0	0	10	0	0						
„ 24 „	5	3	2	6	2	2	10	0	0	10	0	0						
„ 48 „	4	0	6	4	2	4	10	0	0	10	0	0						
nach 3 Tagen	2	0	8	3	4	3												
„ 5 „	1	0	9	0	0	10	10	0	0	9	1	0	10	0	0	10	0	0
„ 6 „	1	1	8	1	0	9	9	1	0	10	0	0	10	0	0	10	0	0
„ 7 „	0	1	9	0	0	10												
„ 14 „	0	0	10	0	0	10				8	2	0						
„ 21 „	0	0	10	0	0	10	9	1	0	8	2	0						
„ 28 „	0	0	10	0	0	10	10	0	0									

Die Bakterienkolonien, die sich aus den einzelnen Gewebefragmenten entwickelten, haben wir in sterilem Wasser suspendiert und im Infiltrationsversuch mit je fünf Pflanzen auf Pathogenität und Identität mit *Pseudomonas phaseolicola* geprüft. Negativer Befund (—) bedeutet, daß entweder das geprüfte Gewebefragment auf dem Nährboden steril blieb oder daß die auf dem Agar gewachsenen Kolonien Fremdinfectionen waren. Bei positivem Ausfall unterschieden wir zwei Grade: Es entwickelten sich so reichlich Erreger-Kolonien, daß diese in 100 cm³ Wasser aufgeschwemmt, starke Infektion (d. h. viele Fettflecke auf den Primärblättern, starke Wachstums- hemmung usw.) an den Testpflanzen hervorriefen (++), oder es erschienen innerhalb von drei Tagen auf dem Nährboden nur vereinzelt kleine Kolonien, die nur schwache Infektion (d. h. einzelne Flecke auf den Primärblättern

und zum Teil erst Mosaikverfärbung des zweiten Folgeblattes) an den Testpflänzchen verursachten (+).

Am einfachsten erwies sich die Isolierung von Gewebefragmenten aus den Gelenkpolstern der Blattstiele, in denen die Leitbündel zentral verlaufen, und aus den Knoten der Sproßachse. Hier konnten wir mit sterilen Rasierklingen die äußeren Gewebepartien abschneiden und die Leitbündelzone herauschälen. Das isolierte Gewebefragment wurde mit Hilfe einer ausgeglühten Lanzettnadel auf Agar übertragen, von allen Seiten auf dem Agar abgestrichen und schließlich leicht in die Oberfläche des Agars eingedrückt. Im Internodium der Sproßachse liegen die Leitbündel peripher und sind von der Epidermis nur durch eine dünne Zone von Rindenparenchym getrennt. Wir haben ein mehrmals in sterilem Wasser abgespültes Stück des Internodiums an einer Seite längs aufgeschlitzt und mit Nadeln auf einem Objektträger in einem Tropfen sterilen Wassers auseinandergebreitet. Mit Pinzetten ließen sich die Leitgewebsstränge herausheben und auf Agar überführen. Die Präparation gelang auch mit Hilfe einer ausgezogenen, am Mundstück mit einem Wattefilter versehenen Glaskapillare, die von der mehrmals mit Rasierklingen erzielten Schnittfläche des Internodiums aus in die Leitbündelzone eingestochen wurde. Den Inhalt der Kapillare, der aus Saft und wenig Gewebefragmenten bestand, haben wir auf Agar ausgeblasen. Beide Methoden ergaben die gleichen Resultate. Die Zahl der Fremdinfectionen war bei sterilem Arbeiten gering. Viele ließen sich schon nach der Beschaffenheit der Kolonien erkennen und ausschalten.

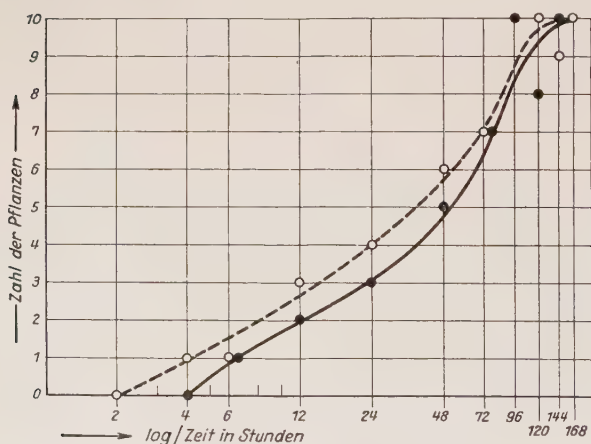


Abb. 1. Beziehungen zwischen der Einwirkungsdauer des primären Infektionsherdes, der Anzahl Pflanzen mit positivem Erregerbefund im Nodium des injizierten Primärblattes und der Anzahl Pflanzen mit Mosaiksymptomen.

- — ● { Abszisse: Zeit der Entfernung des Primärblattes
Ordinate: Anzahl Pflanzen mit Mosaiksymptomen
- - - - ○ { Abszisse: Zeit der Probeentnahme aus dem Primärblatt-Nodium
Ordinate: Anzahl Pflanzen mit positivem Bakterienbefund im Primärblatt-Nodium

Eine Wanderung der Bakterien von der Infektionsstelle in die Sproßachse in einer verhältnismäßig kurzen Zeit ist mit diesem Versuch grundsätzlich nachgewiesen. Erstaunlich ist jedoch der Umstand, daß nur ganz vereinzelt ein Nachweis von Bakterien oberhalb des Primärblattnodiums gelingt. Der Schluß, daß die Bakterien kaum weiter in der Sproßachse aufwärts wandern, erscheint indessen verfrüht, da im Verlauf der Erkrankung nekrotische Flecke weit oberhalb am Sproß auftreten können, aus denen der Erreger isoliert worden ist.

Vergleicht man beide Versuche (Tabellen 1, 2), so ergibt sich eine Be-

ziehung zwischen dem Auftreten von Mosaik und dem Vorkommen von *Pseudomonas phaseolicola*-Zellen im Knoten des Primärblattes. Je länger das infizierte Primärblatt an der Pflanze verbleibt, desto größer ist die Zahl der Pflanzen mit positivem Erreger-Befund im Primärblattnodium und gleichzeitig die Zahl der Pflanzen mit Mosaiksymptomen an Blättern oberhalb des Nodiums (Abbildung 1). Auch in dem bereits erwähnten Auftreten stark oder schwach ausgeprägter Mosaiksymptome zeigt sich eine Beziehung zum Bakterien-Befund, da schwache Symptome meist dann vorhanden sind, wenn sich aus dem Knotengewebe nur wenige Kolonien des Erregers entwickeln (Abbildung 2).

Das Vorhandensein von Bakterien im Leitbündelgewebe der Sproßachse dürfte demnach als Voraussetzung für das Auftreten von Mosaik zu betrachten sein. Die Frage, ob und in welchem Umfang auch im Sproß oberhalb des Primärblattnodiums *Pseudomonas*-Zellen auftreten, wurde nochmals eingehend mit einer verfeinerten Methodik untersucht.

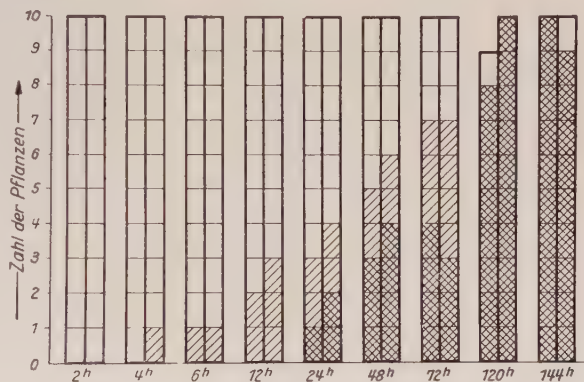


Abb. 2. Starke und schwache Mosaikbildung in Beziehung zur Einwirkungsdauer des primären Infektionsherdes und zum Bakteriennachweis im Primärblatt-Nodium. In den Paaren von Blockdiagrammen bedeutet jedes Kästchen eine Pflanze, und zwar:

- links:
- gesunde (mosaikfreie) Pflanze
 - Pflanze mit schwachen Mosaiksymptomen
 - Pflanze mit starkem Mosaik
- rechts:
- Pflanze, bei der im Primärblatt-Knoten der Erreger nicht nachgewiesen werden konnte
 - Pflanze, bei der sich aus dem Knotengewebe nur einzelne Kolonien des Erregers entwickelten
 - Pflanze mit hohem Bakteriengehalt des Knotengewebes

Die durch Injektion in eines der Primärblätter infizierten Pflanzen wurden in verschiedenen Zeitintervallen nach der Infektion über dem Erdboden abgeschnitten. Nach Entfernung sämtlicher Blätter haben wir die Sproßachse während einiger Minuten mit einem scharfen Leitungswasserstrahl abgespritzt und sie in 3 bis 5 cm lange Stücke zerlegt. Um die Außenflora möglichst weitgehend zu reduzieren, wurde jedes Stück zehnmal in sterilem Leitungswasser gespült und danach mit sterilem Filtrierpapier abgetrocknet. Als dann haben wir die Stücken unter Beachtung ihrer natürlichen Aufeinanderfolge in etwa 1 mm dicke Scheiben zerlegt. Wir benutzten hierzu sterilisierte Rasierklingen in der Weise, daß für jeden Schnitt ein ungebrauchter Teil der Schnittfläche verwendet wurde. Schließlich lagen auf einer Klinge etwa zehn Schnitte nebeneinander in der richtigen Reihenfolge, in der sie danach mit ausgeglühten Lanzettnadeln auf den Nährboden gelegt und etwas eingedrückt wurden. In derselben Weise wurde mit den Blattstielen verfahren. Für die Auswertung ist zu beachten, daß die Schnittserien in den Petrischalen mit Notizen über die Herkunft aus bestimmten Abschnitten der Sproßachse oder der Blattstiele ver-

schen werden (Abb. 3). Die Identifizierung der auf den Petrischalen gewachsenen Keime mit dem Erreger erfolgte wie früher durch Infiltrationsversuch mit je fünf Pflanzen.

Zerlegung der Sproßachse und des Primärblattstieles in Schnitte und Prüfung auf das Vorhandensein von *Pseudomonas phaseolicola* auf Fleischextrakt-Agar. In der schematischen Darstellung der Pflanze ist angegeben, wo die Injektion erfolgte (Pfeil) und aus welcher Zone die Schnitte in der betreffenden Petrischale stammen. In den Petrischalen sind jeweils der oberste (apikale) Schnitt des Sproßabschnittes (X) und die Reihenfolge der Schnitte durch einen Pfeil bezeichnet. In der Pflanze ist nach Testung im Infiltrationsversuch bei jedem einzelnen Schnitt der positive (schwarz) oder negative (weiß) Ausfall des Erreger-Nachweises eingetragen. Die Petrischalen lassen an verschiedenen Stellen Fremdinfectionen (F) erkennen, so auf der Petrischale links unten eine *Mycoides*-Kolonie.

Der Vorteil dieser verhältnismäßig empfindlichen, wenn auch umständlichen Methode bestand darin, daß tatsächlich jeder Millimeter von Sproßachse und Blattstielen geprüft werden konnte. Fremdinfectionen ließen sich nicht vermeiden, hielten sich jedoch bei einiger Übung und bei sorgfältigem Arbeiten in erträglichen Grenzen. Im ungünstigsten Fall wuchsen bei den ersten Versuchen aus etwa 50 % der Schnitte einer Petrischale Fremdinfectionen. Meist war der Befall geringer. Ein Kontrollversuch bestätigte, daß Zellen des Erregers außen auf dem Sproß nicht oder zum mindesten nicht in störenden Mengen vorhanden waren: Wir haben die Oberfläche 1,5 bis 2 cm langer Stückchen der Sproßachse infizierter Pflanzen, deren Schnittflächen mit Paraffin verschlossen waren, ohne weitere Vorbehandlung mehrfach auf Fleischextrakt-Agar abgestrichen. Es wuchs zwar eine beträchtliche Anzahl von Pilzen und Bakterien, jedoch ließ sich durch den morphologischen Vergleich und durch den Infiltrationsversuch nachweisen, daß keine Kolonien von *Pseudomonas phaseolicola* darunter waren.

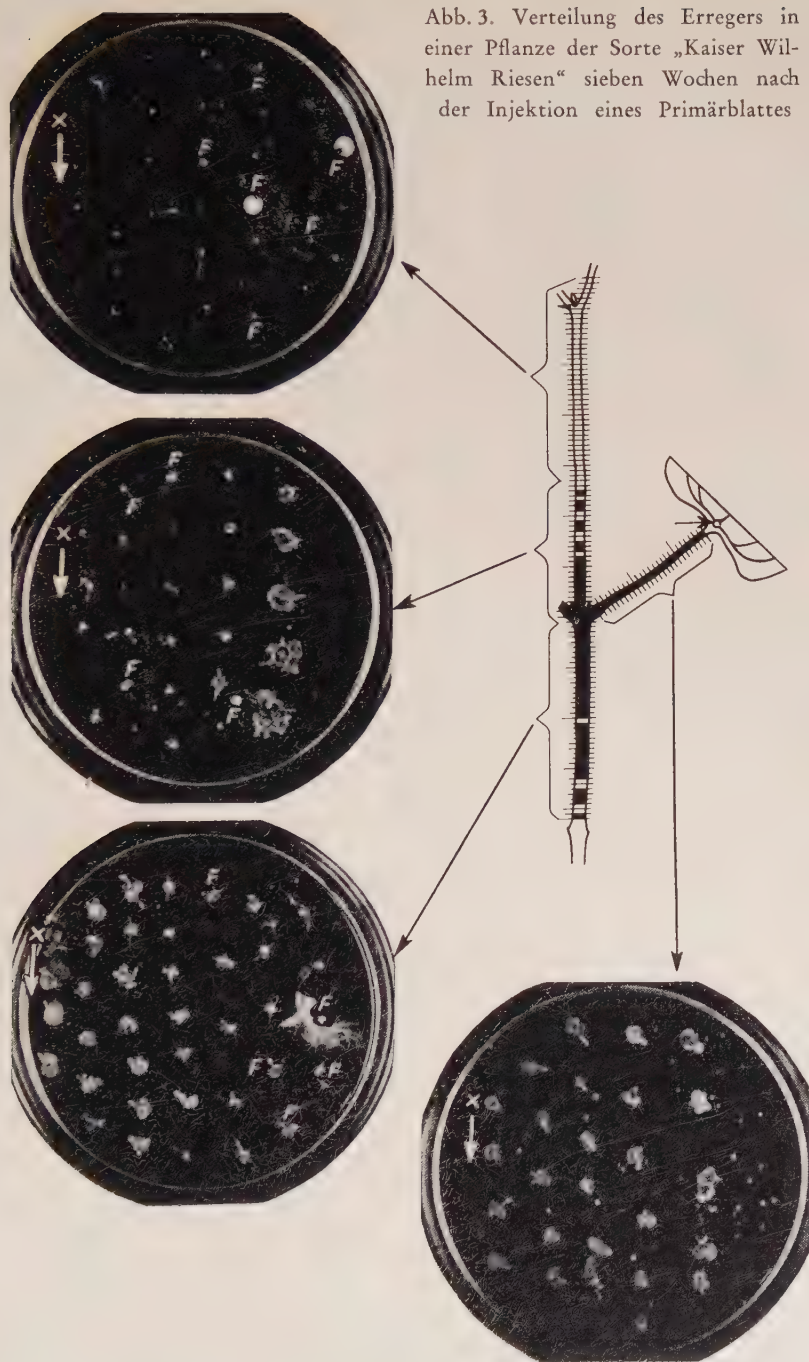
Aus den Untersuchungen an etwa 30 infizierten und erkrankten Pflanzen ergibt sich ein wesentlich klareres Bild von der Verteilung der Erreger.

Allen Pflanzen gemeinsam ist, daß Blattstiele und dazugehörige Nodien von infizierten Primärblättern Krankheitserreger enthalten. Nach drei Tagen lassen sich Bakterien dort nachweisen, und während einer Beobachtungsdauer bis zu vier Wochen sind sie ständig vorhanden, ein Beweis dafür, daß *Pseudomonas phaseolicola* sich an diesen Stellen ansiedelt und sie nicht nur durchwandert (Abb. 4, 5).

Ein kontinuierliches Vordringen der Bakterien im Sproß haben wir dagegen nicht festgestellt. Die zerstreut vorkommenden Bakterien in den oberen Sproßteilen wurden vermutlich durch den Transpirationsstrom dorthin verschleppt. Sind sie einmal dorthin gelangt, so können sie sich natürlich ansiedeln und Fettflecke und Nekrosen erzeugen.

Daß der Transpirationsstrom als wesentlicher Faktor beteiligt ist, scheint daraus hervorzugehen, daß Pflanzen, die erst nach Ergrünen des ersten Folgeblattes infiziert worden waren, eine stärkere Ausbreitung des Erregers zeigten (Abb. 5). Zur Zeit der Infektion transpirierte das Folgeblatt bereits; Bakterien, die vom Primärblatt aus bis in die Leitbündel der Sproßachse im Knoten der Primärblätter gelangten, wurden offenbar vom Transpirations-

Abb. 3. Verteilung des Erregers in
einer Pflanze der Sorte „Kaiser Wil-
helm Riesen“ sieben Wochen nach
der Injektion eines Primärblattes



strom bis in den Bereich des ersten Folgeblattnodiums und weiter mitgerissen.

Bei Pflanzen, die zur Zeit der Infektion außer den Primärblättern noch kein transpirierendes Blatt besaßen (Abb. 4), brauchte die Knospe des Sproß-

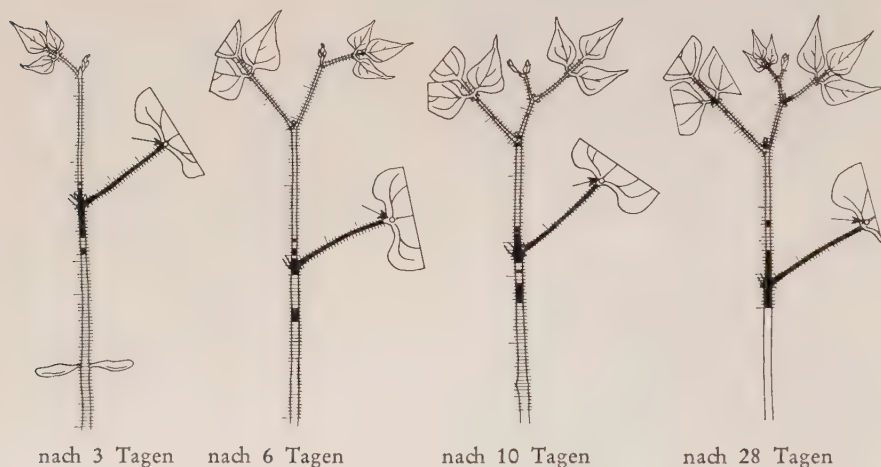


Abb. 4. Verteilung von *Pseudomonas phaseolicola* in Pflanzen der Sorte St. Andreas, die vor Entfaltung der Folgeblätter am Primärblatt infiziert worden waren (Kennzeichnung positiver und negativer Befunde wie bei Abb. 3; die Injektionsstelle ist durch einen Pfeil angedeutet)

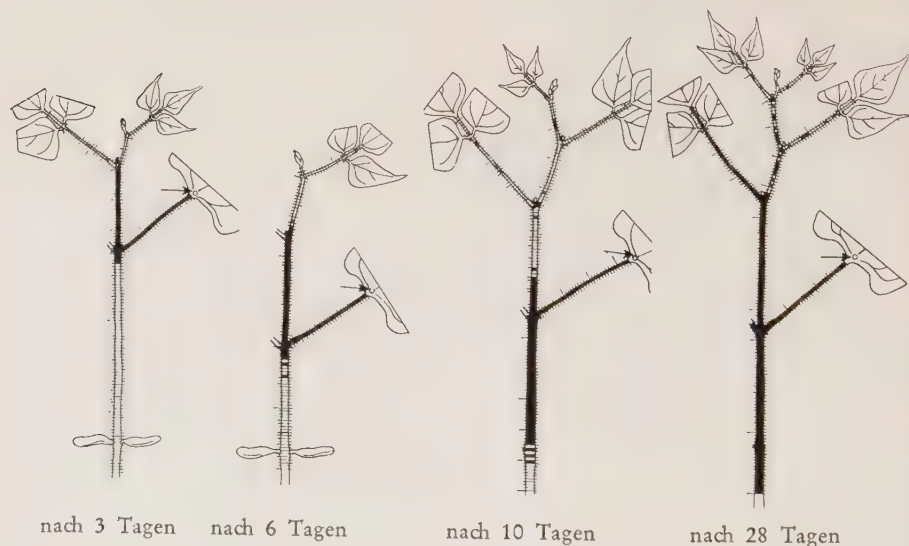


Abb. 5. Verteilung von *Pseudomonas phaseolicola* in Pflanzen der Sorte St. Andreas, die nach Entfaltung und Ergrünen des ersten Folgeblattes am Primärblatt infiziert worden waren (Kennzeichnung positiver und negativer Befunde wie bei Abb. 3; die Injektionsstelle ist durch einen Pfeil angedeutet)

vegetationspunktes drei bis fünf Tage zur Entfaltung. Das erste Folgeblatt ist dann durch die vorhergegangene Infektion bereits in seinem Wachstum gestört. Die Transpiration der Folgeblätter wird auch weiterhin kaum normal verlaufen; die Wahrscheinlichkeit, daß Bakterien durch den Transpirationsstrom nach oben verschleppt werden, dürfte also geringer sein.

Eine eindeutige Beziehung zwischen dem Auftreten des Mosaiksymptoms und der Wanderung der Bakterien haben wir nicht feststellen können. Die Frage, ob zur Ausbildung des Mosaik-Bildes die unmittelbare Anwesenheit der Erreger in den Blättern erforderlich ist, muß nach diesem Versuch verneint werden, wenn man nicht annehmen will, daß die Bakterien zwar in der Sproßachse über weite Strecken fehlen, wohl aber in den Blattspalten der Mosaikblätter zugegen sind. Um diese Möglichkeit zu prüfen, haben wir eine Untersuchung der Mosaikblätter angeschlossen.

Die zu prüfenden Blattspalten wurden, nachdem sie erst in fließendem Leitungswasser, dann in sterilem Wasser abgespült worden waren, einzeln in sterilen Petrischalen 24 bis 48 Stunden bis -8°C gefroren und bei Zimmertemperatur aufgetaut. Die Blattspalten haben wir mit Hilfe ausgeglühter, breiter Pinzetten über dem Nährboden ausgequetscht und den Zellbrei verteilt. Die Petrischalen standen bei 27°C im Brutschrank; die sich entwickelnden, verdächtigen Bakterienkolonien haben wir wie üblich durch Infiltration auf Pathogenität geprüft.

Zuvor hatten wir festgestellt, daß Reinkulturen der Erreger durch Gefrieren bis -35°C während 24 Stunden nicht geschädigt werden und ihre Virulenz nicht einbüßen.

Da die Außenflora besonders älterer Blätter sehr groß ist und sich auch durch Abspülen nur wenig reduzieren läßt, traten viele Fremdinfectionen auf. Um eine ungünstige antagonistische Beeinflussung etwa vorhandener Erreger durch zu dichten Bewuchs nach Möglichkeit auszuschließen, haben wir zur Auswertung nur Schalen benutzt, bei denen die Fläche der vorhandenen Kolonien zusammengenommen höchstens die Hälfte der Oberfläche des Nährbodens bedeckte.

Tabelle 3

Isolierung der Fettfleckenenerreger aus Blattspalten
von infizierten Pflanzen

Prozent Blätter mit positivem Bakterienbefund

Zeit in Tagen nach der Injektion am Primärblatt	Erstes Folgeblatt mit Mosaik	Erstes Folgeblatt ohne Mosaik	Zweites Folgeblatt mit Mosaik
4	8,3		
7	29,3		
14	52,8	41,7	25,0
28	47,2	50,0	55,6
56	72,2	66,7	75,0

Wir untersuchten zum gleichen Zeitpunkt je zwölf Blätter verschiedener Größe und damit auch verschieden stark ausgeprägter Mosaiksymptome, da ja, wie bereits erwähnt, die Stärke der Mosaiksymptome mit der Größe der ausgewachsenen Blätter abnimmt (Tabelle 3).

Aus den Versuchen geht hervor, daß Mosaiksymptome nicht von der unmittelbaren Anwesenheit von Bakterien in den Blättern abhängig sind. Ein hoher Prozentsatz aller untersuchten Mosaikblätter war frei von Krankheitserregern. Aus der Anwesenheit von *Pseudomonas phaseolicola* in den Blättern ohne Mosaiksymptome geht andererseits hervor, daß die Anwesenheit von Erregern im Blattgewebe nicht unbedingt zur Mosaikfärbung führen muß.

Die Tatsache, daß in jungen Mosaikblättern weniger häufig Erreger nachzuweisen waren als in älteren, läßt den Schluß zu, daß die Erreger erst später in das bereits mosaikverfärbte Blatt eingeschleppt worden sind.

Die Unterschiede im Vorkommen der Erreger in den Sprossen infizierter Pflanzen von Sorten verschiedener Resistenz sind nicht grundsätzlicher Art. Selbst bei den sehr wenig anfälligen Sorten „Hundert für Eine“ und „Kaiser Wilhelm Riesen“ (Abb. 3) ließen sich noch sieben Wochen nach der Injektion bei fehlenden Symptomen Erreger in den Geweben nachweisen, wenn auch nicht in dem Maße wie bei der hochanfälligen Sorte „St. Andreas“.

2. Wirkung keimfreier Filtrate

Das Fehlen einer eindeutigen Beziehung zwischen der Anwesenheit des Erregers in den Blattspreiten und dem Auftreten von Mosaiksymptomen macht es erforderlich, einer von BURKHOLDER (1930) und BÖNING (1934) geäußerten Vermutung nachzugehen und auf das Vorhandensein eines vom Erreger erzeugten Toxins zu prüfen.

Beim Vorhandensein eines Toxins müßte es gelingen, Krankheitssymptome, in unserem Fall Mosaiksymptome, unabhängig von der Anwesenheit des Erregers in der Pflanze auszulösen. Auf diese Weise haben PLATTNER und CLAUSEN-KAAS (1944) Welketoxine in den Kulturfiltraten von *Fusarium lycopersici* nachgewiesen. JOHNSON und MURWIN (1925) haben Wildfeuer-Symptome bei Tabakpflanzen mit zellfreien Extrakten von *Pseudomonas tabaci* erzeugt.

Da sich die Sorte St. Andreas als besonders anfällig erwiesen hatte und regelmäßig Mosaikbilder zeigte, sind wir von ihr ausgegangen.

Zur Herstellung keimfreier Filtrate von Kulturen des Erregers haben wir für größere Flüssigkeitsmengen eine Berkefeld-Filterkerze, für kleinere Mengen Membranfilter nach ZSIGMONDY im Ultrafiltrationsgerät nach THIESSEN¹⁾ mit den Membranfiltern „mittel“ Gruppe 5 und 6 und „fein“ Gruppe 7 benutzt²⁾.

Bei der Gewinnung des Ausgangsmaterials für die Filtration sind wir in verschiedener Weise vorgegangen.

- a) Vorkultur der Erreger in Petrischalen auf Fleischextrakt- oder Möhrenagar während zwei, vier und zehn Tagen bei 25 ° C. Abschwemmen von je zwei dicht bewachsenen

¹⁾ Membranfiltergesellschaft, Sartorius-Werke A. G. & Co., Göttingen

²⁾ Als Porendurchmesser werden angegeben: 250 μ mittel/400 μ maximal, 200 μ mittel/300 μ maximal und 175 μ mittel/275 μ maximal.

Schalen mit 100 cm³ Leitungswasser. Suspension steht vor der Filtration 24 Stunden im Eisschrank (4° C) oder bei Zimmertemperatur.

- b) Vorkultur zwei und vier Tage wie bei a). Bakterienmasse mit dem Spatel ab-sammeln, im Mörser mit Quarzpulver oder Carborundum während 30 Minuten zerreiben und in verschiedenen Mengen aqua dest. aufschwemmen. Sofort filtrieren oder zunächst einige Stunden bei Zimmertemperatur oder im Eisschrank stehen-lassen.
- c) Vorkultur wie bei b). Bakterienmasse von je fünf dicht bewachsenen Petrischalen in ein Blockschälchen sammeln und während 24 Stunden bei — 35° C gefrieren. In aqua dest. bei Zimmertemperatur auftauen und in etwa 150 cm³ aqua dest. auf-schwemmen¹⁾. Filtration sofort oder nach 12 Stunden Eisschrank.
- d) Vorkultur während acht Tage in Bohnensaft²⁾. Filtration.
- e) Vorkultur während fünf bis acht Tage in keimfrei filtriertem Preßsaft aus gesunden „St. Andreas“-Pflanzen. Filtration. (Herstellung des Preßsaftes: Pflanzen zerschneiden, während 24 Stunden bei — 8° C gefrieren, nach dem Auftauen mit der hydraulischen Presse bei etwa 80 atü in einem Stahlgefäß auspressen. Filtration durch Berkefeld-Filterkerze.)
- f) Vorkultur während acht Tage in synthetischer Nährlösung³⁾. Filtration.
- g) Keimfrei filtrierte Preßsäfte aus infizierten und erkrankten Pflanzen. Herstellung der Preßsäfte: Pflanzenteile während 24 Stunden bei — 8 bis — 12° C gefrieren. Nach dem Auftauen bei 80 bis 100 atü auspressen. Filtration. Herkunft des Pflanzen-materials aus:
 - g₁) Mosaikblättern ohne sonstige Symptome.
 - g₂) Mosaikblättern mit Fettflecken (meist Primärblätter aus Samen-infiltrierten Pflanzen).
 - g₃) Sproßachsen und Blättern mit Mosaik- und Fettfleckensymptomen aus Samen-infiltrierten Pflanzen (Hypokotyl, Kotyledonen, Epikotyl und Primärblätter) oder aus Pflanzen, die als Keimpflanzen infiziert worden waren (Hypokotyl, Kotyledonen, Epikotyl, Primär- und Folgeblätter).

Relative Keimfreiheit der verschiedenen Präparationen ließ sich auch durch Temperatureinwirkung erzielen. Bakteriensuspensionen wie Preßsäfte wurden im Wasserbad während 1^h bei 50—51° C gehalten und enthielten danach keine lebenden Krankheitserreger mehr.

Je nach den zur Verfügung stehenden Flüssigkeitsmengen wurde durch Infiltration oder durch Injektion infiziert.

Da Mosaiksymptome um so regelmäßiger und stärker auftreten, je jünger die Blätter zur Zeit der Infektion waren, haben wir mit den Präpa-raten (a) und (c) Keimpflanzen infiziert, teils mit grünen Primärblättern, teils solche, deren Kotyledonen, noch ganz oder teilweise von der Samen-schale umgeben, die gelben Primärblätter zwischen sich einschlossen. Die Samenschale wurde in diesem Fall vor der Behandlung entfernt. Noch jüngere Entwicklungsstadien haben wir durch Infiltration von Samen mit (a), (c), (d) und (f) erfaßt.

Um bei der Injektion möglichst viel der in geringeren Mengen zur Ver-fügung stehenden Lösung von (b), (e) und (g) in eine Pflanze hineinzu-bringen, injizierten wir außer wie üblich in die Primärblätter auch in deren

1) Die Suspension enthielt noch lebende Zellen.

2) Nach JENSSEN und LIVINGSTONE. (1944) aus 200 g Bohnenblättern und 1000 cm³ aqua dest. hergestellt. Das Wachstum in diesem Medium geht langsam vor sich.

3) Nach CLARA (1934) K₂HPO₄ 1 g, MgSO₄ anhydr. 1 g, Asparagin 5 oder 10 g, aqua dest. 1000 cm³ · pH 7,5 bis 7,7.

Blattstiele und Gelenke, sowie in die Sproßachse unterhalb der Primärblätter und möglichst nahe unterhalb der jungen Endknospe. Ein gelegentlich vorkommender Austritt von Flüssigkeit während der Injektion ist hier ohne Bedeutung.

Nur mit dem Filtrat aus Erregerkulturen in keimfrei filtriertem Bohnenpreßsaft (e) gelang es uns, Symptome an gesunden Bohnenpflanzen zu

erzeugen: vier bis sechs Tage nach der Injektion wurden auf den Primärblättern deutlich heller grüne, chlorotische Zonen bemerkbar, die in ihrem Aussehen an den „Hof“ der Hofflecke erinnerten (Abb. 6), jedoch keine zentrale Nekrose aufwiesen. Nach Entfaltung des ersten Folgeblattes erschien auf ihm eine leichte Mosaikfärbung. Das Mosaiksymptom trat in allen Fällen nur schwach auf, es war am stärksten zwei bis vier Tage nach der Entfaltung (Abb. 6), wurde dann mit zunehmender Größe des Blattes schwächer, bis es nach acht bis zehn Tagen wieder verschwand und das Blatt vollständig ergrünte. Die weiteren Folgeblätter entwickelten sich normal grün. Eine Wachstumsstörung trat nicht auf.

Der Versuch wurde unter denselben Bedingungen an drei verschie-

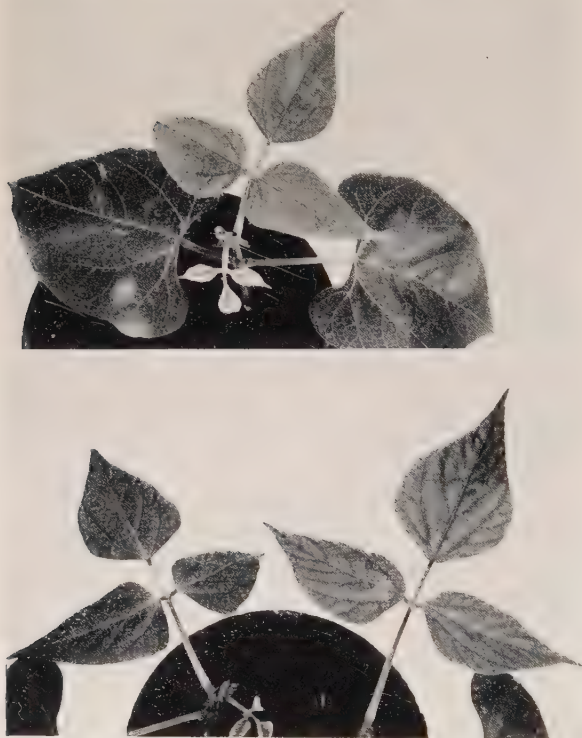


Abb. 6. Oben: Pflanze der Sorte „St. Andreas“ zehn Tage nach Injektion eines keimfreien Filtrates aus *Pseudomonas*-Kulturen in Bohnenpreßsaft. Die Injektion erfolgte in die Primärblätter und in die Sproßachse. Auf beiden Primärblättern sind chlorotische Zonen sichtbar, das erste Folgeblatt zeigt eine schwache Mosaikfärbung. Unten: Das rechte Blatt zeigt deutlich eine leichte Mosaikverfärbung. Links: Erstes Folgeblatt einer unbehandelten Kontrollpflanze

denen Tagen mit je sechs Pflanzen wiederholt. In jeder Serie waren an mindestens vier Pflanzen die Symptome vorhanden.

Obgleich die Keimfreiheit der Infektionsflüssigkeit schon durch Ausstrich auf Agar nachgewiesen worden war, haben wir bei jeder Serie zwei Pflanzen noch einmal auf das Vorhandensein von Fettflecken-Erregern unter-

sucht. Sproßachse und Blattstiele dieser Pflanzen wurden in Scheiben geschnitten und auf Fleischextraktagar ausgelegt. Erreger ließen sich weder morphologisch noch durch anschließende Infiltrationsversuche mit Zellen aus verdächtigen Kolonien nachweisen.

Mit keinem einzigen der übrigen acht keimfreien Filtrate konnten gleiche oder ähnliche Erscheinungen auf gesunden Pflanzen hervorgerufen werden. Die Pflanzen blieben ohne Symptome, entwickelten sich normal und unterschieden sich in nichts von unbehandelten Kontrollpflanzen. Auch die Verletzungen, die durch den Einstich der Injektionsspritze hervorgerufen wurden, verheilten bei den behandelten Pflanzen ebenso wie bei Wasserkontrollen ohne die geringste Spur einer chlorotischen Zone.

3. Wachstum des Fettfleckenerregers in Bohnenpreßsaft

Bei den soeben besprochenen Versuchen erhielten wir gutes Wachstum der Erreger im Preßsaft aus Pflanzen einer hochanfälligen Sorte. Es erschien

Tabelle 4

Wachstum des Erregers in Preßsaft einer anfälligen und einer wenig anfälligen Bohnensorte

Serie	Preßsaft der Sorte :	Einsaat pro Reagenzglas Anzahl der Zellen (Mittelwert)	Reagenzglas	mittlere Keimzahl pro 0,1 cm ³ Preßsaft nach :				
				24 Std.	48 Std.	72 Std.	96 Std.	8 Tagen
I	Hundert für Eine	26	a	2	—	—	—	—
			b	—	—	—	—	—
		146	a	4	—	—	—	—
			b	—	—	—	—	—
	St. Andreas	33	a	5	106	∞	∞	∞
			b	3	143	∞	∞	∞
		126	a	165	∞	∞	∞	∞
			b	17	114	∞	∞	∞
II	Hundert für Eine	21	a	2	4	6		
			b	3	8	1		
		139	a	17	10	4		
			b	7	4	1		
	St. Andreas	17	a	—	—	—		
			b	3	—	1		
		69	a	23	8	16		
			b	18	11	17		
III	Hundert für Eine	130	a	119	36	16	11	1
			b	162	48	38	17	—
		306	a	180	115	151	134	1
			b	302	497	169	92	4
	St. Andreas	28	a	108	582	∞	∞	∞
			b	87	504	∞	∞	∞
		87	a	507	∞	∞	∞	∞
			b	435	∞	∞	∞	∞

uns wichtig, festzustellen, wie sich der Erreger im Preßsaft weniger anfälliger Bohnensorten verhält.

Wir haben den Preßsaft wiederum durch Einfrieren der Sproßachsen und Blätter bei etwa -8°C und durch Auspressen des aufgetauten Materials bei etwa 80 atü gewonnen. Nach keimfreier Filtration durch eine Berkefeld-Filterkerze wurden je $2,5\text{ cm}^3$ Preßsaft in sterilen Reagenzgläschen mit $0,1\text{ cm}^3$ von Bakterienaufschwemmungen mit hohem und niedrigem Keimgehalt versetzt. Als Kontrolle diente nicht beimpfter Preßsaft, der während der Versuchsdauer keimfrei blieb. In Abständen von 24 Stunden haben wir aus jedem gut durchgeschüttelten Röhrchen je $0,1\text{ cm}^3$ Flüssigkeit genommen und zur Ermittlung des Keimgehaltes in Fleischextraktagar ausgesät.

Die Versuche wurden mit der wenig anfälligen Sorte „Hundert für Eine“ und zu Vergleichszwecken nochmals mit der hochanfälligen „St. Andreas“-Bohne ausgeführt. Der pH-Wert beider Preßsäfte betrug 6,5.

Die ersten Versuchsreihen verliefen widerspruchsvoll oder ergaben bei Verwendung junger Pflanzen bei beiden Sorten gutes Wachstum. Wir sind schließlich so vorgegangen, daß wir die Preßsäfte aus erwachsenen, vor der Blüte stehenden Pflanzen hergestellt und sie sofort verwandt haben.

Auch dann waren die Ergebnisse noch nicht völlig eindeutig (Tabelle 4). Immerhin ergab sich bei zwei von drei Versuchsserien, daß *Pseudomonas phaseolicola* im Preßsaft der wenig anfälligen Sorte schneller oder langsamer ausstarb, während im Preßsaft der anfälligen Sorte eine intensive Vermehrung erfolgte. Die Versuche werden fortgesetzt.

III. Diskussion

Da einerseits eine Allgemeininfektion durch den Erreger (BURKHOLDER 1926, ZAUMEYER 1932, STAPP 1933, BÖNING 1934 u. a.) festgestellt und andererseits die Wirksamkeit eines Bakterientoxins (BURKHOLDER 1930, BÖNING 1934, HARTER und ZAUMEYER 1944) bei der Entstehung des Mosaiks der Blätter und der Höfe der Hofflecke angenommen worden ist, haben wir uns um einen genaueren Einblick in die Zusammenhänge zwischen der Wanderung der Bakterien in der Pflanze und der Entstehung chlorotischer Symptome bemüht.

Ein Vordringen der Erreger von der Infektionsstelle an der Blattspreite zum Blattnodium findet zweifellos statt, ebenso eine Ausbreitung in basaler und besonders in apikaler Richtung im Sproß. Es scheint sich, soweit größere Entfernungen von der Injektionsstelle in Frage kommen, allerdings nicht um eine gleichmäßige, kontinuierliche, aktive oder passive Wanderung, sondern um ein einzelnes, zufälliges Vorkommen von Bakterienzellen zu handeln.

Ein unmittelbarer Zusammenhang zwischen dem Auftreten chlorotischer Symptome und der Anwesenheit von Bakterien in den betreffenden, oberhalb der Infektionsstelle gelegenen Blättern besteht nicht.

Mosaikblätter können bakterienfrei oder bakterienhaltig sein, und Bakterien können auch in gesunden Blättern auftreten. Die Anwesenheit von Bakterien in Mosaikblättern scheint demnach sekundärer Natur zu sein.

Die Hauptmasse der Bakterien scheint sich im Nodium des infizierten Blattes anzusammeln und zu vermehren — bei unseren Versuchen im Nodium des Primärblattes. Es lag die Vermutung nahe, daß dort ein lösliches Agens (Toxin) erzeugt wird, das in die Blattanlagen wandert und Chlorosen hervorruft.

Der Nachweis eines wirksamen, keimfreien Agens gelang uns nur, wenn die Erreger in keimfrei filtriertem Preßsaft von Bohnenpflanzen kultiviert wurden. Alle anderen Versuche blieben ergebnislos. Wir leiten daraus ab, daß es einer Wechselwirkung zwischen dem Erreger und Inhaltsstoffen der befallenen Gewebe bedarf, wenn das Toxin entstehen soll. Hierfür scheint auch das Zurücktreteten oder Fehlen von Mosaiksymptomen bei weniger anfälligen Sorten, trotz Anwesenheit des Erregers, zu sprechen.

Die Wirksamkeit des Toxins ist verhältnismäßig schwach. Bei normalem Verlauf der systemischen Infektion erkrankten nur junge, noch nicht ergrünte oder zum mindesten noch im Wachstum begriffene Blätter. Bei der Mosaikbildung wird es anscheinend gebunden, da das Filtrat aus dem Preßsaft von Mosaikblättern wirkungslos ist. In der infizierten Pflanze wird es vermutlich ständig in kleinen Mengen neu gebildet; solange die Mosaiksymptome sich ausbreiten, manifestiert es sich. Im filtrierten Preßsaft infizierter Keimpflanzen läßt sich das Toxin nicht nachweisen; vermutlich weil der Gehalt an Erreger-Zellen und Toxin gering ist, verglichen mit dem Keimgehalt im direkt infizierten Preßsaft. Andererseits reicht auch bei älteren infizierten Pflanzen der Toxingehalt nicht mehr zur Mosaikerzeugung aus, wenn der Abstand zwischen dem infizierten Primärblatt und den nächsten jungen Blattanlagen mehr als zwei bis drei Internodien beträgt.

Wirken die Bakterien direkt auf das Parenchym der Blätter ein, so entstehen auch bei schon ergrüntem, ausgewachsenen Blättern chlorotische Höfe um die Infektionsstelle. Das gleiche ist der Fall, wenn das keimfreie Filtrat aus Preßsaft-Kulturen direkt z. B. über Spaltöffnungen dem Blattparenchym zugeführt wird.

Auch die Hemmung des Längenwachstums wird vermutlich durch ein Toxin verursacht. Wir haben noch nicht untersucht, ob es mit dem Mosaiktoxin identisch oder von ihm verschieden ist.

Bei Kulturversuchen im Preßsaft von Bohnenpflanzen schien das Wachstum schlechter zu sein, wenn der Preßsaft von Pflanzen einer wenig anfälligen Sorte stammte. Da jedoch auch andere, noch nicht eindeutig erfaßte Faktoren, wie z. B. das Alter der Bohnenpflanzen, mitspielen, lassen sich die Zusammenhänge noch nicht vollständig überblicken.

Zusammenfassung

1. Innerhalb weniger Stunden dringen die Erreger vom Infektionsherd in den Primärblättern bis zur Sproßachse vor. Die Weiterverbreitung der Erreger über größere Strecken erfolgt nicht kontinuierlich und in großen Mengen, sondern unregelmäßig durch vereinzelte Bakterien, die sich lokal vermehren und Nekrosen erzeugen können.

2. Charakteristische Symptome einer systemischen Infektion sind Mosaikfärbung der Blätter, Stauchung der Sproßachse und Zurückbleiben der Blattentwicklung.
3. Mosaiksymptome an den Blättern sind nicht an die Anwesenheit des Erregers in den Blättern gebunden.
4. Typische Mosaikfärbung der Blätter tritt nur dann auf, wenn das verursachende Agens auf junge, noch in der Entfaltung begriffene, noch nicht ergrünte Blätter einwirkt.
5. Gelangt das Agens erst während des weiteren Wachstums der Blätter zur Einwirkung, so entsteht nur eine schwache Mosaikfärbung. Ausgewachsene, grüne Blätter werden nach systemischer Infektion nicht mehr chlorotisch.
6. Es ist nicht gelungen, in zellfreien Kulturfiltraten oder in den aufgeschlossenen Zellen von *Pseudomonas phaseolicola* ein mosaikerzeugendes Agens (Toxin) durch Injektion oder Infiltration in Bohnenpflanzen nachzuweisen, wenn die Kultur in künstlichen Medien erfolgte.
7. Auch mit Preßsäften aus infizierten und erkrankten Pflanzen lassen sich keine Mosaiksymptome in gesunden, jungen Pflanzen erzeugen.
8. Wenn man *Pseudomonas phaseolicola* im keimfreien Preßsaft aus gefrorenen und wieder aufgetauten Bohnenpflanzen kultiviert, so lassen sich mit dem Filtrat der Kulturflüssigkeit im Injektionsverfahren Mosaiksymptome in den Blättern gesunder, junger Bohnenpflanzen erzeugen.
9. Das mosaikerzeugende Toxin entsteht offenbar nur bei Wachstum des Erregers in der Pflanze oder bei Kultur in nicht erhitztem Preßsaft.

Literaturverzeichnis

- BÖNING, K., 1934: Versuche zur Bekämpfung der Fettfleckenkrankheit der Bohnen. Prakt. Bl. f. Pflanzenbau u. Pflanzenschutz 11, 265—269.
- BURKHOLDER, W. H., 1926: A new bacterial disease of the bean. Phytopathology 16, 915—927.
- —, 1930: The bacterial diseases of the bean. A comparative study. Cornell Univ. Agr. Exp. Sta. Mem. 127, 125—135.
- CLARA, F. M., 1934: A comparative study of the green fluorescent bacterial plant pathogens. Cornell Univ. Agr. Exp. Sta. Mem. 159, 27—28.
- GÄUMANN, E., 1951: Pflanzliche Infektionslehre. Verlag Birkhäuser, Basel.
- HARTER, L. L. and ZAUMEYER, W. J., 1944: A monographic study of bean diseases and methods for their control. U. S. Dept. Agr. Techn. Bull. 868.
- JENSEN, J. H. and LIVINGSTONE, J. E., 1944: Variation in symptoms produced by isolates of *Phytophthora medicaginis* var. *phaseolicola*. Phytopathology 34, 471—480.
- JOHNSON, J. and MURWIN, H. F., 1925: Experiments on the control of wildfire of tobacco. Wisc. Agr. Exp. Sta. Bull. 62, 1—35.
- PLATTNER, P. A. und CLAUSEN-KAAS, 1944: Über ein welkeerzeugendes Stoffwechselprodukt von *Fusarium lycopersici*. Helv. Chim. Acta 28, 188—195.
- STAPP, K., 1933: Verfahren zur Prüfung von Bohnen (*Phaseolus vulg.*) auf Resistenz gegen *Pseudomonas medicaginis* var. *phaseolicola*. Angew. Bot. 15, 241—252.
- WAITZ, L., GASSNER, G. und SCHWARTZ, W., 1956: Untersuchungen über die von *Pseudomonas phaseolicola* (Burkh.) hervorgerufenen Fettfleckenkrankheit der Bohne. Zbl. Bakt. II. Abt. (Im Druck).
- ZAUMEYER, W. J., 1932: Comparative pathological histology of three bacterial diseases of bean. J. Agr. Res. 44, 605.

*Aus der Abteilung Phytopathologie des Institutes für Pflanzenzüchtung
Bernburg der Deutschen Akademie der Landwirtschaftswissenschaften
zu Berlin*

Abt.-Leiter: Prof. Dr. E. Mühle

**Über die Bedeutung
der Sporendichte bei der künstlichen Infektion von
Linum usitatissimum L. mit *Colletotrichum lini* Manns et Bolley**

Von

K.-H. KUHFUSS

Mit 3 Abbildungen

I. Einleitung und Problemstellung

Es ist bekannt, daß bei Überschreiten der numerischen Infektionsschwelle eine Infektion nicht nur mit größerer Sicherheit haftet, sondern die Schwere der Erkrankung zunimmt. Es ist jedoch für zahlreiche Krankheiten nicht geklärt worden, ob auch eine Abhängigkeit des Befallstypus von der Dichte des Parasiten besteht.

Zur Ermittlung des Resistenzverhaltens von *Linum usitatissimum* L. gegen den Erreger der Anthraknose, *Colletotrichum lini* Manns et Bolley, sind von verschiedenen Autoren Untersuchungen durchgeführt worden. EGLITIS (3), KRÜGER (6), NICKL-NAVRATIL (7) sowie HAHN (4) arbeiteten mit Keimpflanzen und wendeten Sprühinfektion an. KOMMEDAHL, CHRISTENSEN und SCHWINGHAMER (5) infizierten das heterotrophe Stadium des Keimlings.

In keinem Falle wurde mitgeteilt, welche Sporendichte gewählt worden war. HAHN untersuchte das Verhalten des Parasiten vor und nach dem Eindringen in die Wirtspflanze. Neben diese Infektionsbilder stellte er die zugehörigen Erscheinungsformen der Erkrankung. EGLITIS wie NICKL-NAVRATIL ziehen nur die Symptome nach erfolgter künstlicher Infektion zur Er-

mittlung der Resistenz heran. EGLITIS unterscheidet dabei fünf Befallstypen, NICKL-NAVRATIL hingegen vierzehn.

Es soll hier nicht diskutiert werden, ob eine vierzehn Typen umfassende Symptomskala zweckmäßig ist, um Resistenzunterschiede zu erfassen. Sofern bei der künstlichen Infektion alle variablen Faktoren konstant gehalten werden, berechtigen die gewonnenen Ergebnisse, an Hand einer sehr stark aufgliederten Skala von Befallstypen, feinste Unterschiede aufzuzeigen. Andernfalls kann es zu Überschneidungen kommen, die keine echten Resistenzunterschiede darstellen, sondern aus der Prüfungsmethodik resultieren.

Darum erhebt sich die Frage, ob verschiedene Sporendichte bei der künstlichen Infektion von Lein mit *Colletotrichum lini* unterschiedlichen Befallsgrad und verschiedenartigen Befallstypus hervorrufen kann.

II. Versuche

a) Methodik

Um das Problem auf möglichst breiter Basis angreifen zu können, wurden drei Infektionsmethoden herangezogen:

1. Übersprühen von Keimpflanzen — 3. Folgeblattpaar — mit einer Sporensuspension (autotrophes Stadium).
2. Eintauchen von Keimlingen in eine Sporensuspension (heterotrophes Stadium).
3. Bepinseln von Keimlingen in Petrischalen auf wasserdurchfeuchtetem Filtrierpapier mit einer Sporensuspension (heterotrophes Stadium).

Der letzte Modus wurde von SCHILLING (9) angewandt, um die Infektionsmöglichkeit des Flachses mittels Sporen von *Colletotrichum lini* zu klären.

b) Durchführung

1. Für die Sprühinfektion erfolgte die Anzucht der Wirtspflanzen in 10-cm-Töpfen. Je Topf wurden 25 Samen in gedämpfte Komposterde ausgelegt. Zwei Wochen nach der Aussaat wurde die Infektion vorgenommen, wobei für jede Sporenkonzentration und Leinsorte acht Töpfe gerechnet wurden. Der Versuch wurde im Gewächshaus ausgeführt.

2. Zur Tauchinfektion wurden ähnlich der amerikanischen Methode (5) Filtrierpapierstreifen von 20 cm Länge und 10 cm Breite vierfach längs gefaltet und mit vier Samen in gleichmäßigen Abständen beschickt. Innerhalb des angefeuchteten Filtrierpapiers keimten die Samen aus, wurden nach drei Tagen durch Eintauchen in eine Sporensuspension infiziert, darauf in Pikierkästen in Erde eingebettet und im Gewächshaus aufgestellt. Es konnten mangels genügenden Saatgutes gleicher Herkunft jeweils nur 40 Samen mit der gleichen Sporenkonzentration behandelt werden.

3. Zur Pinselinfektion wurden je 20 Samen auf angefeuchtetes Filtrierpapier in eine sterilisierte Petrischale eingelegt. Bei beginnender Keimung — gewöhnlich am zweiten Tage — wurde auf jeden Samen mit einem etwa 5 mm breiten Haarpinsel die Sporensuspension aufgetragen. Die Schalen wurden in einem Dunkelschrank untergebracht, der sich in einem entsprechend temperierten Labor befand. Für jede Sporendichte standen 5×20 Samen zur Verfügung.

Mill. Sporen/cm ³	Bernburger Ölfaser	Fladskopf	Lusatia	Löbauer Blau	
Kontrolle	— — — —	— — — —	— — — —	— — — —	Hypokotyl Koryledonen Sproß Laubblätter
0,01	Fl. 2,5 mm ϕ — Fl. nadelst.	Fl. 1—4 mm ϕ — Fl. nadelst., wenig	Fl. 1—3 mm ϕ — —	— Fl. 1—2 mm ϕ , zahlreich Fl. 1—3 mm ϕ , wenig	Hypokotyl Koryledonen Sproß Laubblätter
0,1	Fl. 1—3 mm einzeln Fl. 1—4 mm ϕ , zusammenlaufend — Fl. 1 mm ϕ , zahlreich	Fl. 1—5—10 mm wenig Fl. 2—5 mm ϕ , 75 % kollabiert Fl. 1—5—10 mm, stengelumfassend Fl. nadelst., bis 1 mm ϕ , wenig	Fl. 5—10 mm, zahlreich Fl. 1—3 mm ϕ , zusammenl., zahlreich Fl. 5—10 mm Fl. 1 mm ϕ	Fl. bis 10 mm, wenig Fl. 2—3 mm ϕ , 25 % kollabiert — Fl. 1 mm ϕ	Hypokotyl Koryledonen Sproß Laubblätter
1,0	Fl. 1—3 mm, zahlreich Fl. 4 mm ϕ , 75 % kollabiert Fl. z. T. stengel- umfassend Fl. 1—3 mm ϕ	Fl. 1—3 mm 90 % kollabiert Fl. 1—5—10 mm, $\frac{1}{2}$ stengelumfassend Fl. 1—3 mm ϕ	Fl. 5 mm, zahlreich 90 % kollabiert Fl. 1—3 mm Fl. 1 mm ϕ , zahlreich	Fl. 1—5 mm, zahlreich 100 % kollabiert Fl. 5—10 mm, wenig Fl. 2—3 mm ϕ , zusammenl., zahlreich	Hypokotyl Koryledonen Sproß Laubblätter
10,0	50 % kollabiert 100 % kollabiert Fl. zum Teil stengel- umfassend, zahlreich Fl. zusammenlaufend, zahlreich	Fl. 3 mm, zahlreich 100 % kollabiert Fl. nadelst. bis strichförmig Fl. 1—2 mm ϕ , zahlreich	Fl. 5—8 mm, zahlreich 100 % kollabiert Fl. 1—8 mm, zahlreich Fl. 1—2 mm ϕ zahlreich	Fl. nadelst. bis strichförmig, zahlreich 50 % kollabiert Fl. nadelst. bis strichförmig, zahlreich Fl. zusammenlaufend, 50 % kollabiert	Hypokotyl Koryledonen Sproß Laubblätter

Fl. = Flecke. nadelst. = nadelstichartig.

Die Sporendichte wurde bei den drei Infektionen gleichsinnig variiert. Durch Abschwemmen mehrerer künstlicher Kulturen eines virulenten Stammes von *Colletotrichum lini* (Schräg-Röhrchen, 2 % Biomalz-Agar) mit Leinstengeldekot wurde eine möglichst hochkonzentrierte Sporensuspension hergestellt und in einer doppelten Zählkammer nach THOMA auf ihre Dichte untersucht. Bei allen drei Methoden wurde mit folgenden, durch entsprechende Verdünnung erhaltenen Sporendichten gearbeitet:

0 Sporen je cm ³ Flüssigkeit	= Kontrolle
10 000 Sporen je cm ³ Flüssigkeit	= 0,01 Mill.
100 000 Sporen je cm ³ Flüssigkeit	= 0,1 Mill.
1 000 000 Sporen je cm ³ Flüssigkeit	= 1,0 Mill.
10 000 000 Sporen je cm ³ Flüssigkeit	= 10,0 Mill.

Bei der Sprühinfektion wurde die Menge der Suspension durch Ausblasen von sechs gleichmäßigen Stößen aus einer Mundzerstäuberspritze je Topf weitgehend gleichgehalten. Die quantitative Verteilung des Erregers war bei den beiden anderen Methoden ohne Schwierigkeit¹⁾. Die Inkubationstemperatur wurde auf 22° C eingestellt. Überdeckung der Pflanzen mit Glaskästen nach der Kontamination erbrachte 100 % rel. Luftfeuchtigkeit bei der Sprühinfektion. Die beiden anderen Methoden erforderten in dieser Hinsicht keine besonderen Maßnahmen.

Für alle Versuche wurden folgende Leinsorten, Herkunft Bernburg, aus der Ernte 1953 verwendet: Bernburger Ölfaser, Flachskopf, Sorauer Lusatia und Löbauer Blau.

c) Ergebnisse

1. Sprühinfektion

Am achten Tage nach der Infektion wurde der Versuch bonitiert. Zu diesem Zeitpunkt waren, wie aus Tabelle 1 hervorgeht, bei allen vier Sorten deutlich ausgeprägte Symptome und markante Unterschiede vorhanden. Abb. 1 a—e und Abb. 2 zeigen die Zunahme der Erkrankung bei Lusatia. Es ergaben sich folgende Befallsbilder:

Kontrolle: Hier ließen sich bis zur Bonitur keine Symptome finden, erst nach Ablauf weiterer fünf bis sieben Tage traten hin und wieder Flecke an den Kotyledonen auf, die einer natürlichen Saatgutinfektion zuzuschreiben waren.

0,01 Millionen Sporen/cm³. Während am Hypokotyl keine Erkrankungsmerkmale wahrgenommen werden konnten, zeigten alle vier Sorten Flecke auf den Kotyledonen. Symptomlos blieb ebenfalls bei allen vier Sorten der Sproß, wogegen die Laubblätter von Bernburger Ölfaser, Flachskopf und Löbauer Blau sichtbar erkrankten. Hier traten deutliche, sortenbedingte Unterschiede auf.

0,1 Millionen Sporen/cm³. Zum ersten Male haftete die Infektion auf dem Hypokotyl. Die Ausbildung der Flecke in dieser Region war bei Bernburger Ölfaser gering im Verhältnis zu den anderen Versuchssorten. Die Erkrankung der Kotyledonen führte bei zwei Sorten (Flachskopf und

¹⁾ Die Infektionen wurden in gemeinsamer Arbeit mit der technischen Assistentin Frl. MEISSNER ausgeführt, der ich an dieser Stelle meinen Dank ausspreche.



a

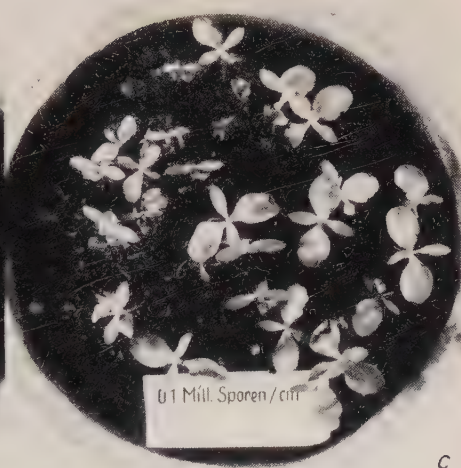
Abb. 1 a—e. Zunahme der Erkrankung des Leines mit steigender Dichte der Sporensuspension nach künstlicher Infektion mit *Colletotrichum lini*.

(Bei Kontrolle, 0,01, 0,1 und 1,0 Mill. Sporen/cm³ wurden die Pflanzen vor ihrer fotografischen Aufnahme bis zu den Primärblättern abgeschnitten)

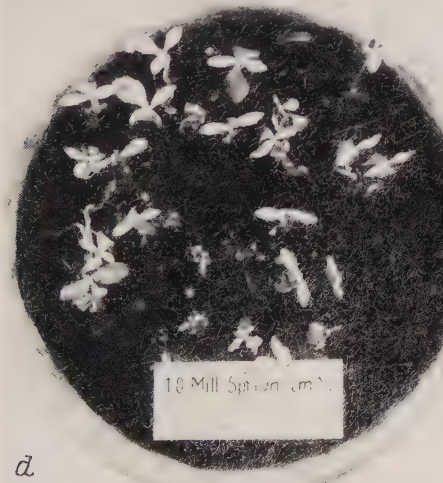
Foto: H. Ulbricht



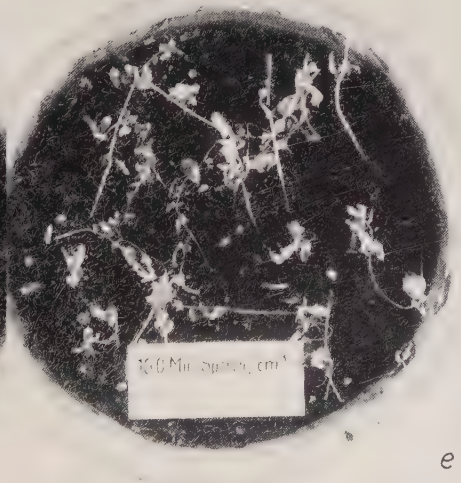
b



c



d



e

Löbauer Blau) bereits zum teilweisen Zusammenbruch dieser Organe. Der Sproß erkrankte nur bei Flachskopf und Lusatia, wobei die Intensität der Fleckenbildung auffiel. Die Laubblätter zeigten annähernd gleiches Verhalten wie bei der Sporendichte 0,01 Mill./cm³.

1,0 Millionen Sporen/cm³. Die Flecke am Hypokotyl nahmen gegenüber 0,1 Mill./cm³ in ihrer Ausdehnung ab, ihre Anzahl jedoch nahm zu. Der Prozentsatz kollabierter Kotyledonen lag bei allen Sorten zwischen 75 und 100. Der Sproß erkrankte hier bei allen vier Sorten. Größe und Anzahl der Nekrosen an den Laubblättern aller Sorten nahmen leicht zu.



Abb. 2. Zunahme der Erkrankung des Leines mit steigender Dichte der Sporensuspension nach künstlicher Infektion mit *Colletotrichum linii*

Foto: H. Ulbricht

10,0 Millionen Sporen/cm³. Die Fleckenbildung am Hypokotyl war bei Bernburger Ölfaser, Flachskopf und Lusatia besonders hinsichtlich ihrer Ausdehnung stärker, während sich für Löbauer Blau das Gegenteil feststellen ließ. Gleichsinniges Verhalten zeigten die Kotyledonen. Die Symptome am Sproß nahmen bei Bernburger Ölfaser und Lusatia nach Anzahl bzw. Ausdehnung zu, wogegen Flachskopf und Löbauer Blau mit einer Verkleinerung der Nekrosen antworteten. Die Laubblätter ließen eine Zunahme der Fleckendurchmesser erkennen. Bei Löbauer Blau kollabierten im Gegensatz zu den anderen Sorten etwa 50% der vorhandenen Laubblätter.

2. Tauchinfektion

Der Versuch wurde am neunten Tage nach der künstlichen Infektion ausgewertet. Trotz der geringen Anzahl von Samen zeichneten sich deutlich

Tendenzen ab. Tabelle 2 zeigt die progressive Schwere der Erkrankung in Abhängigkeit von der Sporendichte.

Tabelle 2
Tauchinfektion mit verschiedener Sporendichte

Mill. Sporen/cm ³	Bernburger Ölfaser			Flachskopf			Lusatia			Löbauer Blau		
	krank	nicht gekeimt	nicht befallen	krank	nicht gekeimt	nicht befallen	krank	nicht gekeimt	nicht befallen	krank	nicht gekeimt	nicht befallen
Kontrolle	3	4	33	0	2	38	1	6	33	1	4	35
0,01	18	4	18	31	1	8	18	15	7	31	1	8
0,1	21	11	8	25	1	14	24	14	2	26	1	13
1,0	28	10	2	31	0	9	24	16	0	33	2	5
10,0	31	9	0	34	2	4	29	11	0	39	1	0

3. Pinselinfektion

Der Versuch wurde am neunten Tage nach der Infektion bonitiert. Die Keimlinge waren inzwischen 2—4 cm lang geworden und zeigten deutlich Symptome an den Kotyledonen, am Hypokotyl sowie zum Teil an den Wurzeln. Die erkrankten Pflanzen wurden prozentual ermittelt (Tabelle 3). Abbildung 3 stellt die Zunahme der Erkrankung bei den angewendeten Sporendichten von *Colletotrichum lini* graphisch dar.

Tabelle 3
Pinselinfektion mit verschiedener Sporendichte

Mill. Sporen/cm ³	Bernburger Ölfaser % erkrankt	Flachskopf % erkrankt	Lusatia % erkrankt	Löbauer Blau % erkrankt
Kontrolle K	11,3	17,6	6,6	10,6
0,01	68,6	42,6	29,3	47,6
0,1	56,3	85,3	53,5	81,6
1,0	94,6	96,0	92,3	93,0
10,0	99,3	92,0	98,0	98,0

Kontrolle. Infolge des Fehlens von Antagonisten, wie diese bei den in Erde zur Sprühinfektion angezogenen Pflanzen wirksam wurden, zeigte sich hier in der Kontrolle schon im Anfang ein verhältnismäßig hoher Grad anthraknosekranker Keimpflanzen.

0,01 Millionen Sporen/cm³. Der Erkrankungsgrad der vier Sorten war voneinander stark verschieden. Während Bernburger Ölfaser zu einem recht hohen Prozentsatz befallen wurde, blieben Flachskopf und Löbauer Blau etwa in gleichem Abstand zurück. Lusatia hingegen erkrankte nur halb so schwer wie Bernburger Ölfaser.

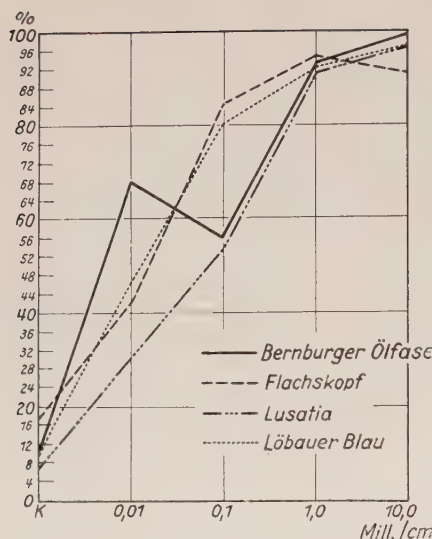


Abb. 3. Abhängigkeit der Erkrankungsrate von der Sporendichte nach künstlicher Infektion von Leinkeimlingen mit *Colletotrichum lini* (Pinselinfektion).

0,1 Millionen Sporen/cm³.

Bernburger Ölfaser wurde weniger stark befallen als bei der zehnfach niedrigeren Sporendichte. Demgegenüber war bei den drei anderen Sorten eine Erkrankungsrate zu verzeichnen, die ungefähr doppelt so hoch lag wie bei der geringeren Sporenkonzentration.

1,0 Millionen Sporen/cm³.

Bei allen vier Sorten war eine sehr heftige, fast gleich starke Erkrankung zu konstatieren.

10,0 Millionen Sporen/cm³.

Bei der Sorte Flachskopf trat eine geringe Verminderung der Zahl erkrankter Keimlinge gegenüber der Sporendichte von 1,0 Mill./cm³ auf, während die anderen drei Sorten ein leichtes weiteres Ansteigen der Erkrankungsrate aufwiesen.

III. Diskussion

Beim Besprühen von Lein mit Sporensuspensionen verschiedener Konzentration von *Colletotrichum lini* zeigen sich unterschiedliche Symptombilder an den oberirdischen Organen der Keimpflanzen. Während bei der Konzentration 0,01 Mill./cm³ alle vier verwendeten Leinsorten nur nekrotische Fleckenbildung an den Kotyledonen aufweisen, ruft die zehnfache Sporendichte bereits eine erhebliche Verstärkung des Krankheitsbildes hervor. Die Flecke nehmen nicht nur an Fläche, sondern auch an Zahl zu, so daß bei Bernburger Ölfaser schon 75 % der Kotyledonen kollabieren. Einer weiteren Erhöhung der Sporendichte folgt zunehmender Zusammenbruch der Keimblätter. Die Gewebe des Hypokotyls wie der übrigen Sproßregionen reagieren auf die verschiedenen Sporendichten unterschiedlich. Die Laubblätter (Primär- und Folgeblätter wurden bei der Auswertung nicht getrennt bonitiert) verhalten sich analog den Keimblättern. Bei 0,01 Mill. Sporen/cm³ bleiben beide Organe symptomlos, während die zehnfach höhere Menge des Erregers das Hypokotyl stark erkranken läßt. Die epikotylen Sproßpartien von Bernburger Ölfaser und Löbauer Blau bleiben selbst hier noch ohne sichtbare Erkrankung. Beim Vergleich des Infektionserfolges von 1,0 mit 10 Mill. Sporen/cm³ fällt die Ausdehnung der Nekrosen am Hypokotyl besonders bei Flachskopf und Lusatia auf. Gleiches Verhalten an den übrigen Sproß-

abschnitten lassen Bernburger Ölfaser und Lusatia erkennen, wogegen Flachskopf und Löbauer Blau mit einer Verkleinerung der Nekrosen antworten.

Es ist also festzustellen, daß die Ausbildung der Symptome bei Lein nach der künstlichen Infektion mit *Colletotrichum lini* wesentlich von der Sporendichte abhängt. Gleichzeitig tritt in Erscheinung, daß die Schwere der Erkrankung mit zunehmendem Erregerpotential ansteigt. In anderen, hier nicht beschriebenen Untersuchungen erwies eine Erhöhung der Sporendichte über 10,0 Mill./cm³ hinaus nur unbedeutende Zunahme des Befalles, was mit Angaben von HAHN (4) übereinstimmt.

Die Ergebnisse der Tauch- und Pinselinfektion lassen ebenfalls erkennen, daß die Intensität der Erkrankung mit zunehmender Dichte des Parasiten steigt. Die Abhängigkeit der Erkrankung von der Sporendichte der verwendeten Erregersuspension tritt bei allen drei Infektionsmethoden in mehr oder weniger gleicher Weise auf. Diese Tatsache erhellt die Bedeutung des Erregerpotentials für die künstliche Infektion und damit für die Exaktheit der Resistenzprüfung des Leines mit *Colletotrichum lini*. Gleiches gilt sowohl für die Identifizierung physiologischer Rassen des Erregers als auch für die Aufstellung einer Skala der Befallstypen.

In diesem Zusammenhang sei auf einige Arbeiten verwiesen, die sich mit Untersuchungen über die Resistenz von Bohnen gegen den Erreger der Brennfleckenkrankheit, *Colletotrichum lindemuthianum* Sacc. et Magn., beschäftigen. BUDDE (1) führte seine Pinselinfektionen am Sproßvegetationspunkt mit Sporensuspensionen bestimmter Dichte aus. PEUSER (8) betonte die Bedeutung der Sporendichte und stellte fest, „daß der Infektionsgrad durch die Menge der bei der Beimpfung verwendeten Konidien in geringen Grenzen verändert werden kann“. Er bezieht sich dabei auf Angaben von DICKSON (2), wonach eine Erhöhung der Sporendichte von 13 000 auf 1 625 000 je cm³ Suspension eine Steigerung der Erkrankung des Weizens durch *Gibberella saubinetii* von 17 auf 45 % bzw. von 7 auf 21 % ergab. Nach PEUSERS Ansicht sind die Verhältnisse bei der künstlichen Infektion von Bohnen mit *Colletotrichum lindemuthianum* ähnlich.

Die experimentell nachgewiesene Abhängigkeit des Befallstypus und der Erkrankungsrate beim Lein von der Sporendichte des Pilzes *Colletotrichum lini* deckt sich daher mit den aus der Literatur bekannt gewordenen Ergebnissen bei der künstlichen Infektion der Bohne mit *C. lindemuthianum*.

Zusammenfassung

Lein (*Linum usitatissimum* L.) wurde in zwei Entwicklungsstadien (1. autotrophes Keimpflanzenstadium, 2. heterotrophes Keimlingsstadium) mit dem Erreger der Anthraknose, *Colletotrichum lini* Manns et Bolley, künstlich infiziert. Durch Verwendung von Sporensuspensionen verschiedener, aber bestimmter Dichte konnten bei sonst gleichen Infektionsbedingungen sowohl differenzierte Befallstypen als auch stärkere Unterschiede in der

Intensität der Erkrankung erzielt werden. Anschließend wurde die Bedeutung der Sporendichte für die Methodik und Auswertung von Resistenzprüfungen des Leines mit dem Erreger der Anthraknose erörtert und auf die Parallelität der Verhältnisse bei *Colletotrichum lindemuthianum* hingewiesen.

Literaturverzeichnis

1. BUDDE, A., 1928: Über Rassenbildung parasitischer Pilze unter besonderer Berücksichtigung von *Colletotrichum Lindemuthianum* (Sacc. et Magn.) Bri. et Cav. in Deutschland. Forschg. Gebiet Pflanzenkrankh. u. Immunität im Pflanzenreich 5, 115—147.
2. DICKSON, I. G., 1923: Influence of soil temperature and moisture on the development of the seedling blight of wheat and corn caused by *Gibberella saubinetii*. J. Agric. Res. 23, 837—869.
3. EGLITIS, M., 1947: Ergebnisse der Resistenzprüfung des Leins für *Colletotrichum lini* Manns et Bolley. I. Bericht. Contrib. Baltic Univ., Pinneberg, No. 30.
4. HAHN, H., 1952: Das Verhalten resistenter und anfälliger Leinsorten gegenüber *Colletotrichum lini* Manns et Bolley. Phytopath. Z. 20, 83—88.
5. KOMMEDAHL, T., CHRISTENSEN, J. J. and SCHWINGHAMER, E., 1950: Prevalence of *Colletotrichum linicolum* on flax seed and seedling infection of flax varieties. Phytopathology 40, 15—16.
6. KRÜGER, E., 1941: Untersuchungen über zwei der bedeutendsten Leinparasiten — *Colletotrichum lini* Manns et Bolley und *Septoria linicola* (Speg.) Gar. (*Sphaerella linorum* Wr.). Arb. Biol. Reichsanst. 23, 163—188.
7. NICKL-NAVATIL, H., 1952: Erfahrungen bei der Zucht anthraknoseresistenter Flachsstämme. Züchter 22, 228—232.
8. PEUSER, H., 1932: Fortgesetzte Untersuchungen über das Vorkommen biologischer Rassen von *Colletotrichum Lindemuthianum* (Sacc. et Magn.) Bri. et Cav. Phytopath. Z. 4, 83—112.
9. SCHILLING, E., 1922: Beobachtungen über eine durch *Gloeosporium lini* verursachte Flachskrankheit in Deutschland. Faserforschg. 2, 87—113.

*Aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft,
Institut für Virusserologie, Braunschweig*

Über den serologischen Nachweis der virösen Rübenvergilbung und den Virusgehalt kranker Rüben*)

Von

R. BERCKS und K. ZIMMER

Mit einer Abbildung

I. Einleitung

Über die Anwendungsmöglichkeiten eines Antiserums (AS) zur Diagnose und zur Erforschung der virösen Rübenvergilbung (RV) liegen in der Literatur nur wenige Angaben vor, obwohl seit Jahren in einigen Ländern mit einem entsprechenden Serum gearbeitet wird. BOOIJ und Mitarbeiter (6) fanden, daß dem Aussehen nach als krank bezeichnete Freilandrüben mit AS im allgemeinen gut reagierten. Eine Anzahl symptomloser Pflanzen, die von einem mit Vergilbung befallenen Felde stammten, gaben ebenfalls positive Reaktionen. Unverdächtige gesunde Pflanzen reagierten nicht. BOOIJ und Mitarbeiter stellten gegen Ende der Vegetationsperiode eine starke Abnahme des Virusgehaltes der Rübenblätter fest und erhielten im November keine positiven Reaktionen mehr. Künstliche Beleuchtung kranker Pflanzen im Gewächshaus während des Winters konnte den Virusgehalt nicht so steigern, daß positive Reaktionen eintraten. Ferner fanden die erwähnten Autoren auch keine Parallele zwischen der Stärke der Symptomausbildung und der Stellung der Blätter an der Rübe einerseits und dem Virusgehalt andererseits. Dagegen zeigten KLECZKOWSKI und WATSON (8), daß vergilbte Außenblätter mit AS stärker als grüne Innenblätter reagierten und, als Infektionsquelle benutzt, einen besseren Infektionserfolg ergaben. In neueren Versuchen von WATSON (9) enthielten ebenfalls ältere vergilbte Blätter mehr Virus als

*) Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für die Unterstützung der Arbeit.

jüngere. GENDRON und LIMASSET (7) stellten bei Samenrüben allerdings den höchsten Virusgehalt in den jüngsten Blättern der gestreckten Sproßachse fest. Sie schätzten die Viruskonzentration nach der Intensität der Flockung und machten keine Angaben über das Alter bzw. den Entwicklungszustand der Pflanzen. Aus den angeführten Untersuchungen lassen sich die Grenzen und Möglichkeiten des serologischen Nachweises der RV nicht erkennen. Aus diesem Grunde prüften wir mit Hilfe eines früher (5) beschriebenen serologischen Nachweisverfahrens: 1. welche Pflanzenteile auf Grund hoher Viruskonzentrationen für serologische Prüfungen besonders geeignet sind, 2. welche Sicherheit der serologische Nachweis bei Gewächshaus- und Freilandrüben verschiedenen Alters besitzt.

II. Material und Methodik

Das von uns benutzte AS reagierte nicht nur mit dem Virusisolat, gegen das es hergestellt war, sondern auch mit dem Virus aus vergilbkrankten Rüben der Herkünfte: Elsdorf (Rhld.), Lübeck, Ülzen, Münster, Braunschweig, Einbeck, Mitteldeutschland. Außerdem reagierte es mit folgenden Virusisolaten: Romagna-Yellow (CANOVA), Sugar beet yellows virus (S. B. Y.), Sugar beet yellows virus Necrotic strain (N.) [Severe etching] (BAWDEN). Das AS reagierte nicht mit dem Virus der Rübenkräuselkrankheit, Rübenmosaikvirus, Yellow-net Virus (Y. N.), Yellow net mild strain (Y. N. M. S.) und Familie 41-Yellow¹⁾.

Für unsere Versuche benutzten wir Zuckerrüben (Sorte Kleinwanzlebener E.), die im Gewächshaus oder im Freiland als Keimlinge zwischen dem 30. April und 6. Juni 1955 infiziert worden waren. Ein Teil der im Gewächshaus infizierten Pflanzen wurde später ins Freiland gepflanzt.

Samenrüben verschiedener Sorten, die im Vorjahr an Vergilbung erkrankt waren, wurden im Frühjahr (2. Mai 1955) ausgepflanzt und vor, während und nach der Blüte untersucht.

Zur Gewinnung des Preßsaftes wurden einzelne Blätter oder Blattteile, bei den Samenrüben z. T. auch Stengelteile, mit Quetschzangen ausgepreßt, die Saftmenge bestimmt und die Viruskonzentration durch Auszählen der Säfte gemessen. Um den absoluten Virusgehalt vergleichen zu können, wurde die serologische Einheit (SE), Saftmenge (in ccm) \times Titer, herangezogen. Wie BERCKS (4) ausgeführt hat, ist die Saftgewinnung durch Handpressen nicht exakt. Darum können kleinere Unterschiede der SE zwischen verschiedenen Blättern vernachlässigt werden.

Für einen Teil der Versuche wurden unterschiedliche Viruskonzentrationen über den „t“-Test gesichert.

¹⁾ Für die Zusendung kranker Pflanzen danken wir den Herren F. C. BAWDEN, M. A., F. R. S./Rothamsted, Prof. CANOVA/Bologna, Prof. Dr. KLINKOWSKI/Aschersleben, Dr. habil. SCHLÖSSER/Einbeck, Dr. HEILING/Münster, Reg.-Rat Dr. STEUDEL/Elsdorf.

III. Experimenteller Teil

A. Rüben in vegetativer Phase

1. Gewächshausrüben

Der früheste Nachweis gelang an Keimpflanzen, wenn die ersten Symptome an den Primärblättern auftraten. In Einzelfällen war er auch schon an Keimblättern und Primärblättern möglich, bevor Symptome erschienen. An älteren Pflanzen konnte das Virus in allen nachwachsenden, selbst symptomlosen Blättern nachgewiesen werden. Insgesamt kann man sagen, daß der Nachweis der RV bei Gewächshausrüben an älteren Blättern in jeder Jahreszeit zu fast 100 % gelingt, wenn die Pflanzen gut ernährt werden.

2. Freilandrüben

a) Blattbereiche

Bekanntlich ist die Symptomausbildung nicht nur auf verschiedenen Blättern, sondern auch auf einzelnen Teilen eines Blattes unterschiedlich. Um die Beziehung zwischen Symptomausbildung und Virusgehalt zu untersuchen, zerschnitten wir mehrere Blätter einzelner Freilandpflanzen in 5—24 Teilstücke. Diese Stücke wurden nach dem Grade der Vergilbung bonitiert und

Tabelle 1
Abhängigkeit des Virusgehaltes von der Vergilbung

Bonitierung	Anzahl der Teilstücke mit demselben Titer										Teilstücke insgesamt	durchschnittlicher Titer	Sicherung ¹⁾				
	0	1	2	4	8	16	32	64	128	256			62,2	52,3	27,9	10,3	3,6
stark vergilbt	7	—	2	2	1	8	1	8	14	1	44	62,2		—	xx	xx xx	xx xx
vergilbt	4	1	3	6	13	18	15	7	15	5	87	52,3	—		x	xx xx	xx xx
leicht vergilbt	8	1	7	10	17	10	3	1	4	3	64	27,9	xx	x		x	xx x
Spuren	15	—	13	25	12	8	1	5	1	—	80	10,3	xx xx	xx xx	x		xx
grün	41	2	17	22	11	6	2	—	—	—	101	3,6	xx xx	xx xx	xx x	xx	
	75	4	42	65	54	50	22	21	34	9	376						

¹⁾ — = Differenz nicht gesichert

x = „ schwach „

xx = „ genügend „

xx = „ gut „

x = „ „

xx = „ sehr gut

xx

ihr Safttiter bestimmt. Dabei zeigte sich, daß zuweilen verschiedene Teile gleicher Färbung bzw. Symptomausbildung desselben Blattes einen sehr unterschiedlichen Titer ergaben. Allerdings ließ der Durchschnitt aller Titerwerte bei den verschiedenen Bonitierungen eine klare Abhängigkeit von der Stärke der Vergilbung erkennen; wie aus Tab. 1 zu ersehen ist.

Dieselben Blattbereiche, die in Tabelle 1 nach der Stärke der Vergilbung geordnet sind, wurden in Tabelle 2 ohne Rücksicht auf Symptome nach ihrer Lage im Blatt aufgeschlüsselt. Dabei zeigt der Durchschnitt der Werte, daß der Virustiter im allgemeinen an der Blattspitze am höchsten war und von dort nach der Basis abfiel. Dieser Befund findet seine Erklärung darin, daß der Prozentsatz stark vergilbter Blatteile an der Spitze höher ist als in der Mitte oder der Basis des Blattes.

Tabelle 2
Abhängigkeit des Virusgehaltes der Blattbereiche
von der Lage im Blatt

Lage im Blatt	Anzahl der Teilstücke mit demselben Titer										Teil- stücke insgesamt	durch- schnitt- licher Titer	Sicherung ¹⁾		
	0	1	2	4	8	16	32	64	128	256			33,3	29,6	17,9
Spitze	20	—	9	8	10	11	6	4	9	3	80	33,3		—	x
Mitte	38	2	18	34	31	25	13	10	21	5	197	29,6	—		x
Basis	17	2	15	23	13	14	3	7	4	1	90	17,8	x	x	
	75	4	42	65	54	50	22	21	34	9	376				

¹⁾ Siehe Erläuterung Tabelle 1.

b) Ganze Rüben

Bei der Untersuchung ganzer Rübenpflanzen (durchschnittliche Blattzahl: 15) konnte das Virus mit wenigen Ausnahmen vom Auftreten der ersten Symptome ab in allen Blättern, einschließlich des Sproßscheitels, nachgewiesen werden. Die Rüben zeigten an den älteren Blättern starke Vergilbung mit dunklen Punkten. Die inneren Blätter waren symptomlos. Im

Tabelle 3

Blatt-Nr. von unten nach oben		Virusgehalt in den												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11		
Rübe in vegetativer Phase am 11.8.1955	Titer	0	128	32	128	128	128	128	64	32	16	8		
	SE	0	190	70	410	420	560	260	250	100	40	20		
Samenrübe vor der Blüte am 1.7.1955	Titer	128	128	128	64	128	64	32	16	16	32	8		
	SE	280	180	310	180	260	130	40	14	16	20	4		
Während der Blüte am 2.8.1955	Titer	0	0	32	32	32	64	32	64	64	64	128		
	SE	0	0	100	110	90	140	110	110	140	140	220		
Nach der Blüte am 29.8.1955	Titer	0	8	1	8	2	4	4	2	4	4	0		
	SE	0	17	1	12	3	2	3	1	2	2	0		

allgemeinen war der Titer bei den Außenblättern hoch (Abb. Kurve a)¹⁾. Den maximalen Wert erreichte er mit 1 : 128 etwa zwischen dem vierten bis siebenten Blatt und fiel erst bei den Innenblättern langsam ab. Die jüngsten Blätter besaßen einen Titer von 0 bis 1 : 2. Sobald die ältesten Blätter abstarben, sank bei ihnen der Titer. Bei den nachwachsenden Blättern stieg er an. Im Rübenkörper konnte das Virus nicht nachgewiesen werden, wohl aber mit geringem Titer in den Blattstielen. Die Werte der SE (Tab. 3) fielen von einer beträchtlichen Höhe in den Außenblättern bis zum Sproßscheitel stark ab. Dieser Abfall ist teilweise durch die infolge geringer Blattgröße abnehmende Saftmenge bedingt.

In weiteren Versuchen prüften wir die Sicherheit des Nachweises an etwa gleichartigen Blättern über einen größeren Zeitraum. Und zwar verwandten wir Blattspitzen aus dem zweiten äußeren Blattkranz. Insgesamt wurden 198 kranke Pflanzen vom 2. Juli bis 2. November mehrfach (bis zu fünfmal, s. Tab. 4) untersucht. Von 637 Proben dieser Pflanzen waren 9 (1 %) unspezifisch, 63 (9 %) negativ und 565 (90 %) positiv. Die positiven Reaktionen waren während der ganzen Untersuchungsperiode klar und deutlich.

B. Samenrübren

Vor der Blüte (vom 28. Juni bis 14. Juli) untersuchte Rüben (durchschnittliche Stengelhöhe: 68 cm, durchschnittliche Blattzahl: 24) hatten in den ältesten Blättern mit 1 : 128 den höchsten Virustiter (Abb. Kurve b). Vom ersten bis fünften Blatt blieb er ungefähr gleich hoch. Zur Spitzenregion hin fiel er dann allmählich auf 1 : 2 bis 1 : 8 in den jüngsten Blättern. In fast allen Stengelabschnitten konnte das Virus mit einem Titer von 1 : 2 bis 1 : 4 nachgewiesen werden. Die Werte der SE, die sich ähnlich verhielten wie der Titer (Tab. 3), erreichten infolge kleinerer Saftmengen nicht die Höhe wie bei den Rüben im ersten Jahr ihres Wachstums.

Während der Blüte (vom 21. Juli bis 10. August; durchschnittliche Stengelhöhe: 158 cm, durchschnittliche Blattzahl: 23) stieg die Viruskonzentration in den mittleren und oberen Blättern auffällig an (Abb. Kurve c).

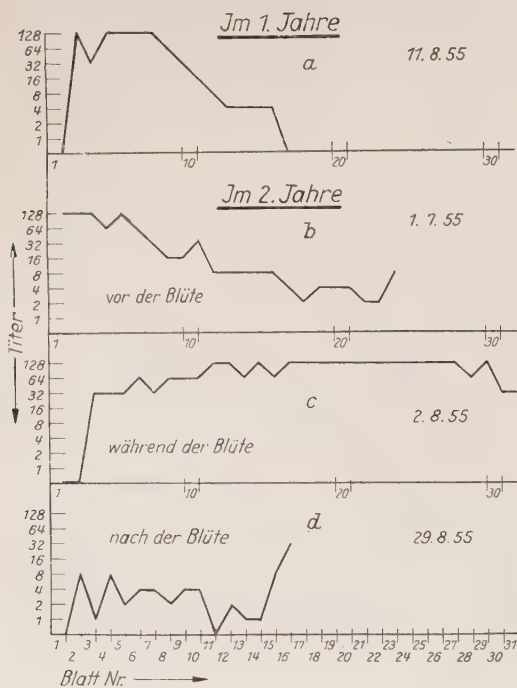
1) Die abgebildeten Kurven der Titerwerte einzelner Pflanzen und die Werte der Tabelle 3 sind subjektiv als Beispiel ausgewählt. Bei anderen Pflanzen traten Abweichungen auf. Die Tendenz aller Kurven entsprach jedoch den angeführten Beispielen.

Blättern verschiedener Rüben

Tabelle 3

[illegible]

Sie erreichte fast überall die Höhe von 1 : 32 bis 1 : 128. Auch Hochblätter und Blüten wurden bei diesen Pflanzen untersucht, indem von ihnen je 100 zusammen ausgepreßt wurden. Der Virustiter dieser Pflanzenteile war etwa 1 : 32. Da die Saftmenge dieser Organe nur gering war, konnte ihre SE nicht bestimmt werden. Das gleiche gilt für die nach der Blüte untersuchten Rüben. Bei den Achseltrieben war die Konzentration in den Hochblättern immer etwas höher als in den Blüten. In den Stengelteilen ließ sich das Virus meistens mit einem Titer von 1 : 2 bis 1 : 4 nachweisen. Die Werte der SE (Tab. 3) erreichten erst bei Blättern im mittleren Stengelbereich ihre höchsten Werte, allerdings nicht die Höhe wie bei unteren Blättern von Samenrüben vor der Blüte. Sie verliefen auf etwa gleichem Niveau bis fast zur Spitzenregion. In den obersten Blättern waren die Werte höher als bei Rüben vor der Blüte.



Nach der Blüte untersuchte Rüben (vom 5. August bis 30. August; durchschnittliche Stengelhöhe: 130 cm, durchschnittliche Blattzahl: 13) hatten in vielen Fällen an den älteren noch vorhandenen Blättern nur einen Titer von 0 bis 1 : 8 (Abb. d). In den Blättern des mittleren Stengelbereiches war der Virustiter unregelmäßigen Schwankungen unterworfen. Er stieg erst in der Blühregion, und zwar bei Hochblättern und grünen Knäueln, auf 1 : 32 bis 1 : 128 an. Bei den Achseltrieben zeigten die Hochblätter eine höhere Viruskonzentration als die grünen Knäuel. Der Nachweis in Stengelteilen gelang nur in Einzelfällen. Die Werte der SE (Tab. 3) sind bei allen Blättern sehr stark gesunken.

Tabelle 4

Ergebnisse wiederholter Prüfungen an 198 kranken Pflanzen

		positiv				
		1 ×	2 ×	3 ×	4 ×	5 ×
1 × getestet	4 Pflanzen, davon	4				
2 × getestet	2 Pflanzen, davon	1	1			
3 × getestet	74 Pflanzen, davon	6	18	50		
4 × getestet	83 Pflanzen, davon	—	5	20	58	
5 × getestet	35 Pflanzen, davon	—	—	2	4	29

IV. Besprechung

Die Abhängigkeit des Virusgehaltes vom Entwicklungsablauf der Pflanzen war schon mehrfach Gegenstand eingehender Untersuchungen. BERCKS (3) fand bei Tabakpflanzen eine Zunahme der X-Viruskonzentration in den oberen Blättern während der Blüte. R. BARTELS (2) wies an Kartoffeln eine auffallende Vermehrung des X-Virus in den oberen Blättern blühender Pflanzen und einen gleichzeitigen Abfall in den älteren, unteren Blättern nach. Ein anderes Verhalten zeigte das von demselben Autor (1) untersuchte A-Virus, das auf Tabak („Samsun“) keinen Anstieg während der Blühphase erkennen ließ.

Bei Rüben haben KLECZKOWSKI und WATSON (8) und WATSON (9) im Gegensatz zu den Angaben von BOOIJ und Mitarbeitern (6) in den äußeren Blättern einen höheren Virusgehalt als in jüngeren Blättern im ersten Jahr des Wachstums gefunden.

In unseren Versuchen zeigten die Rüben in ihrer vegetativen Phase den höchsten Virustiter in älteren Blättern. In der reproduktiven Phase ihres Wachstums war vor der Blüte der Virusgehalt ebenfalls noch in den älteren Blättern am höchsten. Während der Blüte stieg die Viruskonzentration der mittleren und oberen Blätter an. Nach der Blüte war eine starke Abnahme des Virusgehaltes in den älteren Blättern zu beobachten. Dagegen blieb er in den obersten Teilen der Pflanze (Hochblätter und Knäuel) relativ hoch. Diese Ergebnisse lassen vermuten, daß GENDRON und LIMASSET (7) in ihren Versuchen den Virusgehalt von Samenrüben nach der Blüte erfaßt haben.

Bei spät im Jahr infizierten Rüben macht man des öfteren die Beobachtung, daß stark vergilbte Stellen von völlig grünen Blattbereichen begrenzt werden. Außerdem findet man gelegentlich in einem vergilbten Blattkranz ein grünes Blatt. Diese Beobachtungen legten schon die Vermutung nahe, daß das Virus weder die Pflanze noch das einzelne Blatt immer gleichmäßig durchdringt. Unsere Ergebnisse bei der Untersuchung einzelner Blattbereiche bestätigen diese Vermutung. Selbst benachbarte Blattstücke gleichen Aussehens können in der Höhe des Virustiters stark differieren. Im Durchschnitt zeigen jedoch die vergilbten Teile, die vorzugsweise an der Blattspitze liegen, den höchsten Titer.

Für die Sicherheit der serologischen Diagnose der RV ergibt sich also, daß man bei der Untersuchung von Freilandrüben zweckmäßigerweise nach Möglichkeit Mischproben mehrerer vergilbter Blattspitzen der äußeren Blattkränze verwendet.

Die in unseren Versuchen erzielte relativ hohe Sicherheit des Nachweises läßt sich vielleicht noch durch Verwendung geeigneter Seren steigern.

Unsere Versuche sagen noch nichts aus über den Nachweis der RV an spät im Jahr infizierten Rüben. Aber die Tatsache, daß die RV sich in den bisherigen Versuchen auch an symptomlosen Blättern nachweisen ließ, gestattet vielleicht die Hoffnung, in zukünftigen Untersuchungen auch symptomlose Spätinfektionen wenigstens bis zu einem gewissen Grade serologisch erkennen zu können.

Zusammenfassung

Die Untersuchungen hatten zum Ziel, die Möglichkeit und Sicherheit einer serologischen Diagnose der RV zu prüfen. Bei Rüben in vegetativer Phase ist der Nachweis im Gewächshaus unter geeigneten Bedingungen sehr sicher. An frühinfizierten Freilandrüben gelingt es zu verschiedenen Zeiten ebenfalls mit hoher Sicherheit. Diese Rüben zeigen in ihren ältesten Blättern den höchsten Virusgehalt. Innerhalb der einzelnen Blätter ist, von Ausnahmen abgesehen, die Konzentration in den vergilbten Teilen und in den Blattspitzen am höchsten.

Rüben in reproduktiver Phase besitzen vor der Blüte in den ältesten, während der Blüte in den mittleren und nach der Blüte in den obersten Blättern den höchsten Virusgehalt.

Literaturverzeichnis

1. BARTELS, R., 1954: Serologische Untersuchungen über das Verhalten des Kartoffel-A-Virus in Tabakpflanzen. *Phytopath. Z.* **21**, 395—406.
2. — —, 1955: Serologische Untersuchungen über die Konzentration des X-Virus in Kartoffelstauden während der Vegetationsperiode. *Phytopath. Z.* **24**, 421—430.
3. BERCKS, R., 1954: Untersuchungen über Änderungen des Virusgehaltes in Tabakpflanzen während der Vegetationsperiode. *Phytopath. Z.* **22**, 215—226.
4. — —, 1955: Virusgehalt von Tabakpflanzen bei Mischinfektionen durch Kartoffel-X- und -Y-Virus. *Phytopath. Z.* **24**, 407—420.
5. — — und ZIMMER, K., 1956: Untersuchungen über die viröse Rübenvergilbung. *Phytopath. Z.* **25**, 255—266.
6. BOOIJ, H. L., DE BRUYN OUBOTER, M. P., CREMER, M. C. en VAN SLOOTEREN, E., 1944: Verslag van het serologische Onderzoek betreffende de vergelings-ziekte der Suikerbieten 1942—1943. Meded. van het Inst. voor Rationeele Suikerproductie, Bergen op Zoom, **14**, 1—28.
7. GENDRON, Y. et LIMASSET, P., 1950: Titrages sérologiques du virus de la Jaunisse de la Betterave (*Corium betae* Holmes) dans les organes aériens de Betteraves industrielles et de porte-graines infectés. *C. R. Acad. Sci. (Paris)* **231**, 792—793.
8. KLECZKOWSKI, A. and WATSON, M. A., 1944: Serological studies on sugar-beet yellows virus. *Ann. Appl. Biol.* **31**, 116—120.
9. WATSON, M. A., 1955: The effect of sucrose spraying on symptoms caused by beet yellows virus in sugar beet. *Ann. Appl. Biol.* **43**, 672—685.

Besprechungen

Kosswig, W.: Die Symptomatologie der Fusarium-Welken der Gurke (*Cucumis sativus* L.) und ihr Verhältnis zu den Welkekrankheiten anderer Pflanzen. Verlag Paul Parey, Hamburg und Berlin 1955. 148 S., 45 Abb., kart. DM 14,—.

Veranlaßt durch verstärktes Auftreten einer parasitären Welke in Gurkenkulturen unter Glas im Gebiet um Stuttgart und im Rheinland, hat Verf. seit 1948 über diese Krankheit gearbeitet und in dem vorliegenden Büchlein zusammenfassend über seine Beobachtungen und Untersuchungen berichtet.

Nach einem kurzen Hinweis auf die Bedeutung der Symptomatologie als diagnostisches Hilfsmittel werden die Merkmale der von einem *Elegans*- (*F. oxysporum*) und einem *Martiella*-*Fusarium* (*F. solani*) hervorgerufenen Befallsbilder an Gurken verschiedener Altersstadien ausführlich beschrieben und durch zahlreiche Abbildungen veranschaulicht. Die besprochenen Krankheitsbilder sind gekennzeichnet und gegliedert als: 1. akut verlaufende Welke, 2. chronisch verlaufende Welke, 3. Fußkrankheit, 4. Umfallkrankheit, 5. Keimungsschwäche, 6. Wachstumsstörungen. Zum Vergleich mit den an Gurke auftretenden Symptome werden durch *Elegans*- und *Martiella*-*Fusarien* hervorgerufene Krankheitsmerkmale an anderen Pflanzen herangezogen. Insgesamt werden Pflanzengattungen aus 24 verschiedenen Familien besprochen. Die Betrachtungen führen zu der Feststellung, daß die Wirtspflanzen nach den Symptomen, die das Krankheitsbild bestimmen, in eine „Welke-Gruppe“ und eine „Vergilbungs-Gruppe“ eingeteilt werden können. Die Vertreter der beiden Gruppen gehören bestimmten Ordnungen des Pflanzensystems an. Verf. sieht deshalb in der Zugehörigkeit zur einen oder anderen Gruppe Hinweise auf phylogenetische Beziehungen zwischen den betreffenden Ordnungen im System der höheren Pflanzen.

Eine kritische Zusammenschau der durch andere gefäßparasitäre Pilze — *Verticillium*, *Graphium*, *Cephalosporium* usw. — hervorgerufenen Krankheitsbilder bestätigt die Gleichartigkeit der Symptome bei Tracheomykosen, unabhängig von der systematischen Stellung des Erregers. Gefäßparasitäre Erkrankungen werden nicht nur symptomatologisch, sondern auch in ihrer pathologischen Physiologie als eine weitgehend einheitliche Gruppe von Krankheiten angesehen.

Als neu wird ein Befall durch *Fusarium moniliforme* an Gurke genannt, der sich in einer Spitzendürre äußert.

Spricht die Arbeit mit der ausführlichen Beschreibung der verschiedenen *Fusarium*-Befallsbilder an Gurke in erster Linie den praktischen Pflanzenschutz an, so gewinnt sie für einen weiteren Kreis wesentlich an Wert dadurch, daß auch andere Wirtspflanzen und Erreger in die Betrachtungen einbezogen werden. Mit über 300 Literaturangaben und einer fast vollständigen Übersicht über den Wirtspflanzenkreis der *Elegans*- und *Martiella*-*Fusarien* enthält das Büchlein eine Fülle von Hinweisen, die sowohl für Phytopathologen als auch Botaniker der verschiedensten Spezialgebiete wertvoll sein dürften.

GERLACH, Berlin-Dahlem

Schmalfuß, K., Pflanzenernährung und Bodenkunde. 7. Auflage. S. Hirzel Verlag Leipzig, 1955, XII/304 S., 27 Abb. Ganzleinen 7,50 DM.

Das vorliegende Buch ist in erster Auflage 1947 als erster Band einer Lehrbuchreihe erschienen, in der die wichtigsten Fachgebiete der Landwirtschaftswissenschaft in zehn bis fünfzehn einzelnen, für sich abgeschlossenen Bänden in erster Linie den Studierenden und interessierten Praktikern nahegebracht werden sollen. Dementsprechend hat der Ver-

fasser von Anfang an die Darstellung in den drei Hauptabschnitten Boden, Ernährungsphysiologie der Pflanzen und Dünger und Düngung auf die grundlegenden Tatsachen dieser Wissensgebiete beschränkt. Dies geschah in offenbar bewußtem Gegensatz zu manchen anderen Lehrbüchern, die neben der Vermittlung gesicherten Wissens auch durch problematische Ausführungen anregen wollen. Wenn nun von einem Buch in acht Jahren sieben Auflagen erscheinen und keine wesentlichen Änderungen der Form und auch beim Inhalt nur die durch den Fortschritt der Wissenschaft bedingten notwendig sind, zeugt dies von selbst für den großen Kreis der Interessenten und die ansprechende Art der Wissensvermittlung.

Die weitgehende Gliederung der Hauptabschnitte erlaubt eine schnelle Übersicht über die wichtigsten Gesichtspunkte, die z. B. bei der Entstehung des Bodens, der Chemie des Bodens, der Zusammensetzung der Pflanzensubstanz, ihrer Bildung und Umwandlung oder bei der Ernährung der verschiedenen Kulturpflanzen und den einzelnen Formen der Düngung zu berücksichtigen sind. Auch der laufende Text des Buches zeichnet sich durch so klare und straffe Behandlung der einzelnen Unterabschnitte aus, daß sich der Leser leicht und schnell über die gesicherten Grundlagen einzelner Spezialgebiete unterrichten kann. Darüber hinaus sind für eine schnelle Orientierung die „Hauptvermerke“ als besonderer Vorzug hervorzuheben, die am Schluß jedes wichtigen Abschnitts nochmals in wenigen Sätzen das Entscheidende verdichtet zusammenfassen. Am Schluß ist auch ein Nachweis der wichtigsten Lehr- und Handbücher aus dem behandelten Fachgebiet gegeben.

Das Buch ist sowohl für Studierende und Praktiker der Landwirtschaft als auch für alle diejenigen als zuverlässiger Vermittler von Grundkenntnissen anzusehen, für die Pflanzenernährung und Bodenkunde wichtige Randgebiete darstellen. Es ist deshalb auch den Pflanzenpathologen sehr zu empfehlen.

PFEIL, Hann. Münden

Kurze Mitteilung

IV. Internationaler Pflanzenschutz-Kongreß 1957

Der IV. Internationale Pflanzenschutz-Kongreß wird vom 8. bis 15. September 1957 in Hamburg stattfinden. Interessenten, die die weiteren Kongreßinformationen laufend zu erhalten wünschen, werden gebeten, ihre genaue

Anschrift baldigst mitzuteilen an die
Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft,
Braunschweig, Messeweg 11—12

Handbuch der Pflanzenkrankheiten

Begründet von PAUL SORAUER

In sechs einzeln käuflichen Bänden herausgegeben von

Prof. Dr. Dr. h. c. O. APPEL † Geh. Reg.-Rat, Präsident a. D. der Biologischen Reichsanstalt für Land- und Forstwirtschaft	Prof. Dr. Dr. h. c. H. BLUNCK ehem. Direktor des Instituts für Pflanzenkrankheiten der Universität Bonn	Prof. Dr. H. RICHTER Präsident der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft
---	--	--

I. Band: Die nichtparasitären Krankheiten

Ganzleinen

1. Halbband: Allgemeine Pflanzenpathologie, Ernährungs-, Klima- und Temperaturschäden. 6. Auflage 1933. 592 S., 123 Abb.

DM 46,—

2. Halbband: Innere und äußere Faktoren als Krankheitsursachen.

6. Auflage 1934. 553 S., 147 Abb.

DM 44,—

II. Band: Die Virus- und bakteriellen Krankheiten

6. Auflage in 2 Lieferungen

1. Lieferung: Viruskrankheiten. 1954. 786 S., 326 Abb.

DM 150,—

2. Lieferung: Bakterielle Krankheiten, erscheint Sommer 1956

III. Band: Die pflanzlichen Parasiten, 2. Teil (Pilzkrankheiten)

5. Auflage 1932. 948 S., 195 Abb.

DM 66,—

IV. Band: Tierische Schädlinge an Nutzpflanzen, 1. Teil

5. Auflage in 2 Lieferungen

1. Lieferung: Protozoa und Metazoa partim. 1949. 458 S., 210 Abb.

DM 44,—

2. Lieferung: Trichoptera und Lepidoptera. 1953. 526 S., 154 Abb.

DM 116,—

V. Band: Tierische Schädlinge an Nutzpflanzen, 2. Teil

5. Auflage in 5 Lieferungen

1. Lieferung: Diptera und Hymenoptera. 1953. 320 S., 89 Abb.

DM 80,—

2. Lieferung: Coleoptera. 1954. 608 S., 154 Abb.

DM 144,—

Soeben erschien 3. Lieferung: Heteroptera, Homoptera I. Teil, 1956, 408 S., 128 Abb.

DM 94,—

4. Lieferung: Homoptera II. Teil (*Aphidoidea*, *Coccoidea*), erscheint Sommer 1956

5. Lieferung: Vertebrata, erscheint Herbst 1956

VI. Band: Pflanzenschutz, Verhütung und Bekämpfung der Pflanzenkrankheiten

2. Auflage in 4 Lieferungen

1. Lieferung: Die wirtschaftliche Bedeutung des Pflanzenschutzes und seine Aufgaben. 1952. 464 S., 3 Abb.

DM 78,—

2. Lieferung: Physikalische und chemische Bekämpfungsmaßnahmen

3. Lieferung: Biologische Bekämpfungsmaßnahmen und technische Mittel des Pflanzenschutzes

4. Lieferung: Vorbeugungsmaßnahmen, Gesetzgebung, Organisation und Literaturübersicht

(2.—4. Lieferung in Vorbereitung)

Die Lieferungen der Bände II, IV, V und VI sind einzeln käuflich. Besteller, die sich zur Abnahme aller Lieferungen eines dieser Bände verpflichten, erhalten auf die angegebenen Preise des betreffenden Bandes einen Nachlaß von 10 Prozent

VERLAG PAUL PAREY / BERLIN UND HAMBURG

Soeben erschien:

Handbuch des gesamten Gemüsebaues

einschließlich der Küchenkräuter

Von

Dr. h. c. J. BECKER-DILLINGEN

Direktor der Staatlichen Lehr- und Forschungsanstalt für Gartenbau
in Weihenstephan

Sechste, neugestaltete Auflage

770 Seiten mit 253 Abbildungen und zahlreichen Tabellen
Ganzleinen DM 78,—

Das „Handbuch des gesamten Gemüsebaues“ von J. BECKER-DILLINGEN ist seit über 30 Jahren das umfassendste Standardwerk über Gemüsebau in deutscher Sprache und erfreut sich einer ständig wachsenden Wertschätzung im In- und Ausland. Es behandelt eingehend alle Fragen des Gemüsebaues, seine Wirtschafts- und Marktgrundsätze und seine Technik von der Freilandkultur bis zur Gemüsetreiberei. Sämtliche gebräuchlichen Gemüsearten werden entsprechend ihrer wirtschaftlichen Bedeutung ausführlich behandelt; für den Praktiker besonders wertvoll sind die präzisen, auf jede Gemüseart bezogenen Angaben über Sorten, Saat, Wachstumsbedingungen, Fruchtfolge, Düngung, Krankheiten und Schädlinge, Nahrungswert und Verwertung.

Der Name des Verfassers und seine langjährigen Erfahrungen bieten die Gewähr für eine exakte, wissenschaftliche und gründliche Behandlung des Themas, die den modernsten Entwicklungen auf diesem volkswirtschaftlich so wichtigen Gebiet gerecht wird.

Die vorliegende sechste Auflage ist von Grund auf neu geschaffen und dadurch wieder zu einem ganzen, einheitlichen Guß geworden. Völlig umgearbeitet wurden alle den Pflanzenschutz betreffenden Fragen.

Besonderes Gewicht wurde ferner auf betriebswirtschaftliche Fragen gelegt, vor allem auf die des Arbeitsbedarfs, dann auf die der Verpackung, Sortierung und des Verkaufs.

Durch einen Überblick über Wesen, Art und Umfang des ausländischen Gemüseangebots wird die Stellung des deutschen Gemüsebaues herausgehoben.

Eingehende Ausführungen über Fruchtfolgemöglichkeiten, Unterfruchtbau usw. dienen der bestmöglichen Ausnutzung der Flächen.

Die Darstellung der Pflanzenzucht ist durch Einfügen zahlreicher Anzichtsübersichten mit genauen Saat-, Pikier- und Pflanzungsangaben verbessert worden.

Die Bilderung wurde weitgehend erneuert und ergänzt.

Somit ist diese Neuauflage ein nie versagendes Nachschlagewerk für alle Gemüsebaubetriebe, Fachschulen und behördlichen Dienststellen sowie ein unentbehrliches Hilfsmittel für Praxis, Lehre und Forschung.

VERLAG PAUL PAREY / BERLIN UND HAMBURG

Verlag: Paul Parey, (1) Berlin SW 68, Lindenstr. 44-47, Tel. 61 44 68/69. Herausgeber: Prof. Dr. E. Gäumann, Zürich 6, Universitätsstr. 2, Prof. Dr. M. Klinkowski, Aschersleben, Ermslebener Str. 52, und Prof. Dr. H. Richter, Berlin-Dahlem, Königin-Luise-Straße 19. Printed in Germany. Druck von A. W. Hayn's Erben, Berlin SO 36. Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des auszugsweisen Nachdrucks und der photomechanischen Wiedergabe, vorbehalten. — Erscheinungsweise: Jährlich etwa 10 - 12 Hefte (4 Hefte = 1 Band).